

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

OPI DATE 03/07/97 APPLN. ID 10325/97
AOJP DATE 28/08/97 PCT NUMBER PCT/EP96/05260



AU9710325

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ :

C12P 21/02, C12N 15/72, 1/21, C07K
16/28 // (C12N 1/21, C12R 1:19)

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 97/21829**

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum: 19. Juni 1997 (19.06.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/05260

(22) Internationales Anmeldedatum: 28. November 1996
(28.11.96)

(30) Prioritätsdaten:
95119478.6 11. December 1995 (11.12.95) EP
(34) Länder für die die regionale oder
internationale Anmeldung eingereicht
worden ist: DE usw.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MERCK
PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-
64293 Darmstadt (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STRITTMATTER, Wolf-
gang [DE/DE]; Neugasse 59, D-64372 Ober-Ramstadt
(DE). MATZKU, Siegfried [DE/DE]; Wetzbach 24,
D-64673 Zwingenberg (DE). RIESENBERG, Dieter
[DE/DE]; Zenkerweg 3, D-07743 Jena (DE). HORN, Uwe
[DE/DE]; Manniskestrasse 3, D-06567 Bad Frankenhausen
(DE). KNÜPFER, Uwe [DE/DE]; Fritz-Ritter-Strasse 19,
D-07747 Jena (DE). KUJAU, Marian [DE/DE]; Anna-
Siemens-Strasse 55, D-07747 Jena (DE). WENDEROTH,
Rolf [DE/DE]; Dorothea-Veit-Strasse 35, D-07747 Jena

(DE). PLÜCKTHUN, Andreas [CH/CH]; Möhrlistrasse
97, CH-8006 Zürich (CH). KREBBER, Anke [CH/CH];
Fliederstrasse 12, CH-8006 Zürich (CH).

(74) Gemeinsamer Vertreter: MERCK PATENT GMBH; Frank-
furter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, CZ, HU, JP, KR,
MX, NO, PL, RU, SK, UA, US, europäisches Patent (AT,
BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: PROCESS FOR THE PREPARATION OF RECOMBINANT PROTEINS IN E.COLI BY HIGH CELL DENSITY FERMENTATION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON REKOMBINANTEN PROTEINEN IN E. COLI MITTELS HOCHZELLDICHTE-FERMENTATION

(57) Abstract

The invention relates to a fed-batch fermentation method with particular host-vector systems of *E. coli* for effective formation of recombinant proteins, in particular recombinant antibody molecules, preferably antibody fragments such as mini antibodies. In the conditions given the *E. coli* cells can grow at the maximum specific growth rate to very high cell densities. When recombinant product formation starts, only the product formed acts in a limiting manner on growth. Growth limitation by substrates or metabolic by-products does not occur. Consequently, large amounts of recombinant proteins can be produced in relation to space and time.

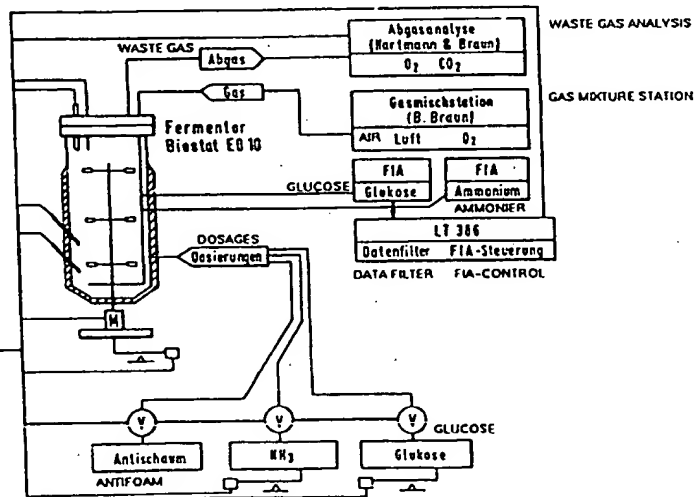
PROCESS COMPUTER

Prozess-Computer
PC 386 - MFC 3
Prozess-Verwaltung
Datenvisualisierung
Datenspeicherung

TASK MANAGEMENT
DATA DISPLAY
DATA STORAGE

BCU
Prozess-Steuerung a
Datenvisualisierung b
Standardregelungen c
d Temperatur f Drehzahl
e Druck g Gewicht
h pH i Antischaum
j Glucose GLUCOSE

a. TASK CONTROL
b. DATA DISPLAY
c. NORMAL ADJUSTMENTS
d. TEMPERATURE
e. PRESSURE
f. SPEED
g. WEIGHT
h. ANTIFOAM



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application No :

U.S. National Serial No. :

Filed :

PCT International Application No. : PCT/EP96/05260

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that :
My name and post office address are as stated below ;
That I am knowledgeable in the German language in which the
below identified international application was filed, and that,
to the best of my knowledge and belief, the English translation
of the international application No. PCT/EP96/05260 is a true
and complete translation of the above identified international
application as filed.

I hereby declare that all the statements made herein of my own
knowledge are true and that all statements made on information
and belief are believed to be true; and further that these
statements were made with the knowledge that wilful false
statements and the like so made are punishable by fine or
imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the
United States Code and that such wilful false statements may
jeopardize the validity of the patent application issued
thereon.

Date : 24 April 1998

Full name of the translator : Gerald David BAIRD
For and on behalf of RWS Translations Ltd.

Post Office Address :

Europa House, Marsham Way,
Gerrards Cross, Buckinghamshire,
England.

**Process for preparing recombinant proteins in E. coli
by means of high cell density fermentation**

5 The invention relates to a fed-batch fermentation process which uses special E. coli host/vector systems for the efficient formation of recombinant proteins, in particular recombinant antibody molecules, in particular antibody fragments such as miniantibodies.

10 Under the conditions according to the invention, the E. coli cells can grow up to very high cell densities at a maximum specific growth rate. After recombinant formation of the product has been switched on, it is only the formed product which has a limiting effect on growth; substrates or metabolic by-products
15 do not limit growth. In this way, and in conjunction with the novel expression vectors which are specially adapted for this purpose and which exhibit high stability, it is possible to achieve high space-time yields of recombinant proteins, which proteins exhibit
20 high biological activity, in particular in the case of antibody fragments.

 The culture of E. coli cells to high cell densities is an essential prerequisite for efficient recombinant protein formation. The following cultures
25 are state of the art for this purpose: following unlimited growth ($\mu = \mu_{\max}$) in the batch phase, a carbon source (glucose or glycerol) is customarily metered in, in the subsequent fed-batch phase, in a limited manner such that the formation of growth-inhibiting by-
30 products, for example acetate, is avoided, with the consequence that the growth can be continued in a manner which is only substrate-limited ($\mu < \mu_{\max}$) until high cell densities are reached (e.g. Riesenbergs et al., 1991, J. Biotechnol., vol. 20, 17-28; Strandberg et al., 1994, FEMS Microbiol. Rev., vol. 14, 53-56; Korz et al., 1995, J. Biotechnol. 39, 59-65; EP-B-0 511
35 226). Growth at a reduced growth rate naturally results

in long fermentation times and consequently also in lower space-time yields. Owing to the immediate consumption, the concentration of the carbon source in the culture solution in these fermentations is virtually zero. The substrate-limited conditions are not altered after the recombinant product formation has been switched on.

Fed-batch cultures which use *E. coli* are also known in which the carbon source is added discontinuously at relatively large time intervals and then in relatively large quantities, with a rise in the pO_2 value usually being used as an indicator of substrate exhaustion for the purpose of initiating the subsequent dose of the carbon source (e.g. Eppstein et al., 1989, *Biotechnol.* 7, 1178-1181). This procedure means frequent switching from relatively long-term substrate excess conditions to substrate limiting conditions and consequently implies metabolic imbalances.

In that which follows, fed-batch cultures are dealt with in which the cells can grow at maximum specific growth rate ($\mu = \mu_{max}$) in the fed-batch phase. Fed-batch cultures in which relatively large quantities of carbon source are added to the culture at relatively large time intervals, in accordance with off-line determinations, for the purpose of avoiding substrate limitations are experimentally elaborate and suffer from the disadvantage that the concentration of the carbon source is constantly changing during the whole of the fermentation (e.g. Pack et al., 1993, *Biotechnol.*, vol. 11, 1271-1277, Hahm et al., 1994, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 100-107).

Fed-batch cultures have also been described in which the concentration of the carbon source is measured on-line and is regulated so that limitations are avoided, although these cultures - in particular in the high cell density region - suffer from the disadvantages which are described below. An autoclavable glucose biosensor for use in microbial fermentations in

stirred tank fermenters has recently been described (M. R. Phelps et al., 1995, Biotechnol. Bioeng., vol. 46, 514-524). It was employed for E. coli cultures. This in-situ sensor provides, with a time delay of
5 approximately 2 minutes, the current value in the culture solution. The signal supplied by the glucose sensor is dependent, inter alia, on the pH and pO_2 . The sensor has not been tested in the high cell density region ($X > 80$ g/l). It is known from experience that
10 growths on in-situ probes when E. coli is used can lead to additional erroneous values at very high cell densities. In addition, it is not possible to recalibrate the sensor exactly during an ongoing fermentation. Instead of being based on measurements
15 using an in-situ sensor, other processes are based, for example, on determining the carbon sources using on-line flow injection analysers (FIA) or on-line HPLC in a culture solution which is removed semi-continuously from the fermenter and rendered cell-free by being
20 subjected to filtration or microcentrifugation (Kleman et al., 1991, Appl. Environ. Microbiol. 57, 910-917 and 918-923; Turner et al., 1994, Biotechnol. Bioeng. 44, 819-829). Prediction and feedback control algorithms have decreased the fluctuations in the glucose
25 concentration during growth up to $X = 65$ g/l (Kleman et al., 1991, Appl. Environ. Microbiol., vol. 57, 910-917). In the region of very high cell densities (from approx. 80 g/l to 150 g/l), it becomes increasingly more difficult and more time consuming to separate the
30 cells and the nutrient solution, so that the time delay in determining the current glucose value in the fermenter also increases in a biomass-dependent manner and makes it more difficult, or impossible, to maintain the glucose level constant. By contrast, the glucose
35 concentration is measured with a time delay which is constant and brief using an appliance which does without this cell separation (Pfaff et al., 1995, pp. 6-11, in: Proceedings of the 6th International

Conference on Computer Appl. in Biotechnol. Garmisch-Partenkirchen, FRG). According to the method of Pfaff et al., an FIA possessing an enzymic-amperometric glucose sensor is employed in the immediate vicinity of the sampling site after the culture has been diluted with a growth inhibitor.

During aerobic culture, *E. coli* cells which are not obliged by the dosage regime to grow in a substrate-limited manner customarily form the metabolic by-product acetate to an increased extent (Riesenberg 1991, Curr. Opinion Biotechnol., vol. 2, 380-384), which acetate accumulates in the nutrient solution and has a growth-inhibitory effect when present in relatively large quantities (Pan et al. 1987, Biotechnol. Lett., vol. 2, 89-94). For this reason, it has only previously been possible to effect fed-batch cultures to high cell densities using special *E. coli* strains whose accumulation of acetate has been reduced by means of specific genetic alterations, while tolerating other disadvantages which are associated with this. The descendants of *E. coli* K12 include phosphotransacetylase-negative mutants (Bauer et al., 1990, Appl. Environ. Microbiol., vol. 56, 1296-1302; Hahm et al., 1994, Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 42, 100-107) whose growth is, however, strongly reduced in glucose/mineral salt media. Phelps and collaborators (see above) used the *E. coli* strain TOPP5 as the host for non-substrate-limited culture up to a biomass of $X = 85 \text{ g/l}$. However, this *E. coli* strain, which evidently does not accumulate acetate in a pronounced manner, is not a K12 strain. *E. coli* TOPP5 forms haemolysin and is consequently a pathogenic strain which is not suitable, for reasons of safety, for use as a host for forming recombinant DNA products in the industrial sector. A reduction in acetate accumulation by means of specifically reorienting the intermediary metabolism was achieved by transforming *E. coli* cells with a plasmid containing a gene encoding acetolactate

synthase (ALS) (San et al., 1994, in: Ann.N.Y.Acad.Sci., vol. 721, 257-267). However, this procedure suffers from the disadvantage that instabilities usually occur under high cell density
5 conditions when an ALS-encoding plasmid is used in combination with a second plasmid carrying the "production" gene. The efficiency of recombinant product formations is frequently decreased by plasmid instabilities, which occur to an increased extent par-
10 ticularly in association with culture to very high cell densities.

Antibodies or antibody fragments, such as Fab', F(ab')₂, miniantibodies or single-chain Fv's, are gaining ever increasing importance in the medical and
15 biotechnological spheres. In that which follows, a miniantibody is to be understood, according to the invention, to be a bivalent or bispecific single-chain Fv fragment which is linked by way of a pseudohinge region. In this context, it can be important, for exam-
20 ple in cancer therapy, to make available large quantities of antibodies (approximately 1 g/dose). In this respect, monovalent antibody fragments or fusion proteins of these fragments, or multimeric or multispecific variants thereof, can be particularly
25 readily and satisfactorily prepared in E. coli. These fragments or variants are of a small size which is associated with a high specific binding capacity. (E.g. Plückthun A., 1992, Immunol. Rev. 130, 151-188; Pack et al., 1995, J. Mol. Biol. 246, 28-34.) However, proteins
30 and antibodies, in particular, must be correctly folded in order to be biologically and functionally active. When considering the yield of formed antibody fragment per cell, attention must be paid to this problem in connection with the cell density. Furthermore, the
35 primary sequence of the antibody is of importance in determining the yield in vitro and the folding in vivo (Knappik A. and Plückthun A., 1995, Protein Engin. 8, 81-89). Thus, Fab fragments, for example, are expressed

as insoluble cytoplasmic or periplasmic aggregates and refolded in vitro. Thus, yields of about 0.14 g/l at low cell density (Condra et al., 1990, J. Biol. Chem. 265, 2292-2295) and of up to about 1-2 g/l of insoluble antibodies at medium cell density (Shibui et al., 1993, Appl. Microbiol. Biotechnol. 38, 770-775) have been reported. Bivalent miniantibodies (Pack et al., 1993, Biotechnol. 11, 1993, 1271-1277) can also be obtained in *E. coli* in biologically functional form in yields of about 0.2 g/l. On average, approximately 5-45% of these yields is properly refolded.

In the known *E. coli* systems, the formation of foreign protein is, as a rule, switched on in a suitable manner, after appropriate cell densities have been reached, by a regulatable promoter system corresponding to the expression system. Examples of promoter systems which may be mentioned here are (i) the araBAD promoter in the presence of the AraC repressor (inducible by arabinose) (e.g. Better et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90, 457-461), (ii) the phoA promoter (inducible by withdrawing phosphate) (e.g. Carter et al., 1992, Biotechnol. 10, 163-167) and (iii) the lac promoter system (inducible by IPTG) (Pack et al., 1993, loc. cit.). While the lac system brings about good expression as a rule, it suffers from the disadvantage that, on the one hand, undesirable basal expression is observed prior to induction of the promoter and, on the other, plasmid instability is observed following induction with IPTG.

In a particular embodiment of the invention, a special vector (pHKK) is described which contains, as the foreign gene, sequences which encode fragments of the murine or humanized antibody Mab 425. Mab 425 (ATCC HB 9629) is a murine monoclonal antibody which was isolated from the known human A432 cancer cell line (ATCC CRL 1555) and binds to the epitope of human epidermal growth factor receptor (EGFR, a glycoprotein of about 170 kD) while inhibiting the binding of the natural

ligand EGF. It has been demonstrated that Mab 425 has a cytotoxic effect on tumour cells or is able to impair the growth of these cells (Rodeck et al., Cancer Res. 1987, 47: 3692). WO 92/15683 discloses humanized and
5 chimeric forms of Mab 425, including the DNA and amino acid sequences of their light and heavy chains.

The object of the invention was to make available a process for preparing foreign proteins, in particular antibody fragments, in recombinant E. coli
10 cells under high cell density conditions (HCDC = high cell density culture) with high space-time yields, and without any substantial impairment of growth by substrates or metabolites and without significant plasmid losses or plasmid instabilities, while ensuring that
15 the expressed protein exhibits a high degree of effective biological activity (binding capacity and correct folding).

The process according to the invention is a multi-step batch process which is primarily notable for
20 the fact that the cells are able to grow at a maximum rate during the whole of the batch ($\mu = \mu_{\max}$). Thus, cell densities of from 100 to 150 g/l (dry weight of biomass) can ultimately be achieved using the described process. Furthermore, the growth is not inhibited to an
25 important extent by acetate accumulation since, surprisingly, such an accumulation is not particularly pronounced under the conditions which are selected, in particular when E. coli strains are used which in any case only tend to form decreased quantities of acetate
30 during the fermentation. This is achieved by, also in association with a series of other additional measures, first and foremost, in the fed-batch phase which is inserted after a batch phase, keeping the concentration of the carbon source in the medium constant in a
35 defined range while maintaining unlimited growth of the cells. By designing the relevant expression vector in an appropriate manner, the undesirable basal expression of protein, prior to switching on protein synthesis by

means of a regulatable promoter system, can also be virtually eliminated, as can the plasmid loss, which is sometimes substantial and which, as already mentioned above, can normally be observed in expression systems using strong promoters such as the lac promoter system.

Protein yields of an average from 3 to 5 g/l can be achieved after a total culture time of from approx. 25 to 35 hours. In the case of the antibody fragments, in particular miniantibodies, which are particularly critical owing to their folding criteria, approximately 80% of the synthesized material is biologically active and correctly folded.

The invention consequently relates to a process for preparing foreign protein, in *E. coli* cells which have been transformed with a plasmid carrying the foreign gene and an inducible promoter, by means of high cell density fermentation by way of batch and fed-batch stages, without any restriction of growth by substrates or metabolic by-products, and isolation and purification of the expressed protein from the culture medium, with the concentration of substrates in the fed-batch phase being controlled using a continuous, automated or semi-automated analysis and addition system, with, in the fed-batch phase, (i) the concentration of the carbon source in the medium being kept constant in a range between 0.1 g/l and 25 g/l while maintaining unlimited growth of the cells ($\mu = \mu_{\max}$), (ii) the production of the foreign protein being started in the said fed-batch phase by inducing the promoter at a cell density of between 10 and 80 g/l, and (iii) utilizable nitrogen and phosphate, and also salts of trace elements, being fed in continuously after induction of product synthesis has taken place, where (iv) the pO_2 value is adjusted to between 5 and 25% during the whole of the fed-batch phase by passing oxygen into the fermentation broth in an appropriate manner.

The values according to the invention for the requisite concentration of the carbon source during the fed-batch phase are in a range from 0.1 g to 25 g/l. A preferred range is between 0.5 and 15 g/l, in particular from 1.0 to 5 g/l, or from 1.0 to 3 g/l. The particularly preferred concentration is 1.5 g/l. Preferred carbon sources which may be mentioned are glucose or glycerol or mixtures of these two compounds. According to the invention, the carbon source is added in a continuous manner (on-line) using an automated or semi-automated addition and analysis system. An on-line flow injection analysis system (FIA) is preferably employed.

The feeding-in of utilizable nitrogen, preferably ammonium nitrogen and phosphate, for example diammonium hydrogen phosphate or ammonium dihydrogen phosphate, and also trace elements, for example salts of boron, manganese, copper, molybdenum, cobalt, iron or zinc which are soluble in the medium, takes place in the fed-batch phase which is inserted after the batch phase, preferably after switching on protein synthesis using the regulatable promoter, at a cell density of from 50 to 80 g/l (dry weight of biomass), preferably at about 70 g/l, at a total growth rate of 100 to 150, preferably 140, g/l.

According to the invention, protein synthesis is switched on, by activating the regulatable promoter system, at a cell density of from 10 to 80 g/l, preferably from 20 to 60 g/l; very particularly preferably, the range is from 40 to 50 g/l.

During the fed-batch phase, the partial pressure of oxygen is between 5 and 25%, preferably between 15 and 25%, very particularly preferably 20%.

According to the invention, the pH of the fermentation medium has to be adjusted, during the whole batch, to between 6.5 and 7.0, preferably to between 6.7 and 6.9, in particular to 6.8.

The invention furthermore relates to a corresponding process in which an expression vector is

employed which possesses an expression cassette which contains the foreign gene and is flanked by two terminator sequences. These terminator sequences, in particular that which is positioned upstream, successfully prevent unwanted expression of protein prior to the expression being switched on by the promoter system. While the terminator t_{hp} (Nohn et al., 1988, J. Bacteriol. 170, 4097-4102) is particularly suitable, other known terminator sequences may also be employed.

The invention furthermore relates to a process in which the expression vector which is employed additionally contains a suicide system. The suicide system produces a protein which is toxic for the cell if the plasmid is not present in the cell. Suitable suicide systems are known from the literature. A suicide system which is particularly suitable for the invention is the hok-sok system (e.g. Gerdes K., 1988, Biotechnol. 6, 1402-1405). Thus, it is important, for the process for effectively forming recombinant proteins, in particular antibody molecules, that the host/vector system is characterized, in the high cell density region, by high plasmid stability, low recombinant basal expression and high product formation. In this context, suicide systems, in combination with recombinant expression cassettes which are flanked by terminators, are vector-specific.

The invention furthermore relates to a corresponding process in which a foreign gene is employed which encodes an antibody fragment, in particular a miniantibody.

The invention also relates to a process in which expression vectors are employed which possess additional features which are described below.

In principle, most of the E. coli strains can be employed which are known and which are suitable for recombination technology and for production on an industrial scale. Advantageously, those strains are preferably used which accumulate relatively little ace-

tate during growth to high cell densities. Those strains are particularly suitable which exhibit an acetate enrichment of less than 5 g/l. Surprisingly, the acetate accumulation can be kept particularly low by using the chosen conditions of the process according to the invention. The well known and commercially available E. coli strain RV308 (ATCC 31608), and its variants having the same effect, is particularly suitable in this regard.

The invention therefore relates, in particular, to a corresponding process in which an E. coli strain is employed which exhibits an acetate accumulation of less than 5 g/l in the culture medium during the fermentation.

The invention also relates to an E. coli expression vector which is suitable for expressing foreign proteins under high cell density fermentation conditions and which exhibits the following features:

- (i) an upstream terminator sequence and a downstream terminator sequence,
- (ii) the lac promoter/operator system,
- (iii) a T7g10 Shine Delgarno sequence,
- (iv) the pelB or ompA signal sequence,
- (v) the sequence of the foreign gene,

and, in a preferred embodiment, also a suicide system, in particular the hok-sok suicide system.

According to the invention, the promoter system can also be replaced by other suitable systems, for example those mentioned above. Likewise, other signal sequences and control sequences having the same effect are also encompassed by the invention.

Finally, the invention relates to the expression vector pHKK (Fig. 2), which is defined by its construction and which contains the sequences for the miniantibody which is derived from Mab 425, and to a special recombinant E. coli host RV308[pHKK], as special embodiments.

Description of the figures:

10 Fig. 1: Experimental set-up of the bioreactor for preparing proteins under high cell density conditions. The system is equipped with a measuring device, a display device, a control device and a metering device.

15 Fig. 2: Optimized expression vector pHKK and constituent parts of its construction. The vector is essentially made up of constituent parts from the known vectors pASK40, pAK100 and pKG1022.

20 Fig. 3(a-d): HCD culture of recombinant E. coli using the example of E. coli RV308[pHKK]: chronological course of biomass, glucose, ammonium nitrogen, phosphate, acetate, stirrer speed, pO₂, O₂ and CO₂ in the exhaust gas, plasmid stability (expressed as % of β -lactamase-positive colonies) and formation of protein (in this case: scFv₄₂₅dhlx). The batch and fed-batch phases are divided into 5 sub-phases. The IPTG arrow indicates the
25
30 start of protein production.

The process according to the invention uses transformed E. coli host cells. The plasmid constructs which are chosen depend on the nature of the protein which is to be expressed. Features of those plasmid
35 constructs which are particularly favourable are described below. The techniques and methods which are required for plasmid construction and for host cell transformation are all known and described in detail in

the literature (e.g. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor). In addition, they are explained in the examples using the particular embodiments of the invention. Starting plasmids or plasmid parts are either obtainable commercially or can be constructed without difficulty using standard methods which are based on known construction schemes.

The preceding batch phase of a typical fermentation, according to the invention, of transformed *E. coli* cells is divided into two subphases. Following inoculation with an appropriate preliminary culture, subphase I is characterized by a lag phase in which the cells adapt and the growth rate μ subsequently rises to μ_{\max} . During subphase II, the cells grow exponentially at $\mu = \mu_{\max}$. After the pO_2 has dropped from 100% saturation down to less than 5-15%, the pO_2 value is adjusted, by controlling the speed of the pO_2 agitator, to pO_2 values which are preferably between 15 and 25%, preferably around 20% (Fig. 3c). This adjustment (by passing in air which is enriched with pure oxygen) should be performed at about 6 to 12 hours after beginning fermentation of the main culture. The glucose concentration, which was preferably initially between 20 and 35 g/l, declines to the end of subphase II, which also constitutes the end of the batch phase preceding the fed-batch phase. In this connection, the glucose concentration values should under no circumstances fall below 0.1 g/l. From now on, this is prevented by the appropriate feeding-in of glucose (subphase III, Fig. 3a, start of the fed-batch phase). In accordance with the invention, the glucose value is kept constant between 0.1 and 25 g/l, preferably, however, between 1 and 3 g/l. The feed medium FS1 (Tab. 1) can, for example, be used for this purpose. Since this glucose concentration range is sufficiently far above the K_s value for glucose (Bergter, 1983, "Wachstum von Mikroorganismen (Growth of microorganisms)", p. 41, Gustav Fischer

Verlag, Jena), the cells can continue to grow at μ_{\max} . According to the invention, the glucose concentration is monitored and regulated using an automated or semi-automated system. Flow injection analyser systems in
5 on-line operation are particularly suitable. Purely manual or largely manual systems have been found to be inappropriate. While the fed-batch phase begins between about hours 15 and 22, this ultimately depends on various individual factors such as temperature, medium
10 composition, medium concentration, reactor size, etc., and in particular also on the nature of the E. coli strain employed. Advantageously, synthesis of the foreign protein is switched on at about from 4 to 8 hours after beginning the fed-batch phase. However, the
15 precise time depends ultimately on the cell density of the culture which has already been reached at this time. Cell densities of between 10 and 80 g/l, preferably between 20 and 60 g/l, are particularly favourable if final cell densities of from 100 to 150 g/l are to
20 be reached. It is consequently generally favourable for starting the protein synthesis if from about 10 to 60% of the maximum cell density to be reached is present at the time of induction.

Protein synthesis is brought about by switching
25 on the regulatable promoter system. Depending on the system which is used, this switching-on is as a rule effected by adding a substance or by altering a physical quantity. In the case of the preferred lac system (promoter, operator and inducer) the switching-on is
30 effected by adding IPTG (isopropyl thiogalactopyranoside). The further growth of the cells is now only restricted by the accumulating product. For this reason, it is important, according to the invention, that no significant basal expression, which would
35 exert an unfavourable influence on total growth and consequently on total yield, can take place prior to induction. According to the invention, this is con-

trived by the expression cassette in the plasmid being flanked by efficient terminator sequences.

From the time at which glucose begins to be fed in, the fermentation medium becomes impoverished in nitrogen and phosphate (Fig. 3a, b). In order to avoid limitations of any nature, nitrogen and phosphate are preferably likewise fed in by means of an appropriate continuous process. Expediently nitrogen is supplied in the form of ammonium salts since, in this way, influence can also simultaneously be brought to bear on the pH (from 6.5 to 7.0, preferably 6.8). For example, the solution FS2 is suitable (Tab. 1). Subphase IV is characterized by the supply, according to the invention, of trace elements (e.g. boron, manganese, iron, cobalt, molybdenum and zinc) in the form of their soluble salts. As a rule, the addition is effected continuously at a constant rate. Subphase V is characterized by reduced growth, primarily due to product accumulation. In addition, a slight increase in the acetate concentration can be observed. However, the accumulation of acetate, and the concentration of acetate, in the medium are surprisingly low. This is also to be attributed to the special process conditions. E. coli strains which exhibit a maximal acetate enrichment during the fermentation of < 5 g/l markedly strengthen this effect still further.

Depending on the nature of the protein, the yields of protein vary on average between 2 and 6 g/l. Of this, between 50 and 95% is biologically active, again depending on the nature of the protein. In the case of antibody fragments, more than 80% of the protein which is obtained is refolded. These values markedly exceed those obtained in comparable processes which have previously been described in the state of the art.

Preference is given to using the process which has been described, including the expression plasmids which have been specially constructed and adapted for

this purpose, for efficiently preparing antibody fragments, in particular miniantibodies. However, it is also possible advantageously to prepare many other proteins, fusion proteins or enzymes using the process
5 according to the invention. Examples of such suitable proteins are hybrid streptokinase and glucose dehydrogenase, or else proteins which have an effect on blood coagulation, for example hirudin, thrombin, hementin or theromin.

Table 1: Composition of the media; FS1, FS2 and FS3 constitute the feed media which are used in the different subphases of the fed-batch phase.

5

	Compound	Preliminary culture medium mg/l	Main culture medium mg/l	FS1 mg/l	FS2 mg/l	FS3 mg/l
1	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	8.6x10 ³				
2	K ₂ HPO ₄	3x10 ³	16.6x10 ³			
3	(NH ₄) ₂ HPO ₄		4x10 ³		227x10 ³	
4	(NH ₄)H ₂ PO ₄				169.5x10 ³	
5	NH ₄ Cl	1x10 ³				
6	NaCl	5x10 ²				
7	Citric acid		2.1x10 ³			
8	Fe(III) citrate hydrate	60.0	75.0			5x10 ³
9	H ₃ BO ₃	3.0	3.8			250
10	MnCl ₂ x4H ₂ O	15.0	18.8			125
11	EDTAx2H ₂ O	8.4	10.5			700
12	CuCl ₂ x2H ₂ O	1.5	1.9			125
13	Na ₂ MO ₄ x2H ₂ O	2.5	3.1			213
14	CoCl ₂ x6H ₂ O	2.5	3.1			213
15	Zn(CH ₃ COO) ₂ x2H ₂ O	8.0	10			668
16	Glucose	10x10 ³	25x10 ³	670x10 ³		
17	MgSO ₄ x7H ₂ O	600	1.5x10 ³	19.8x10 ³		
18	Ampicillin	100	100			

Example 1:

The prototrophic E. coli K12 strain RV308 (lac74-galISII::OP308strA) (Maurer et al., 1980, J. Mol. Biol. 139, 147-161; ATCC 31608) was used to prepare a recombinant E. coli host. Unless explained elsewhere, transformation with a vector which was suitable for the expression, and all other requisite DNA manipulations, were effected using standard

methods. Plasmid-free *E. coli* RV308 cells were employed as the control in a corresponding high cell density fermentation.

The vector pHKK was constructed as follows (Fig. 2): the small *Mlu*I fragment from pAK100 (Krebber and Plückthun, 1995), which contains the strong transcriptional terminator t_{HP} (Nono et al., see above) in the upstream region of *lac* p/o, was inserted into the plasmid pASK40 (Skerra et al., 1991, *Biotechnol.* 9, 273-278). The *hok-sok* DNA was inserted by means of two further cloning steps: the *aphA* gene from pKG1022 (Gerdes, 1988, see above) was removed by double digestion with *Xho*I and *Eco*RI, filled in with DNA polymerase I (Klenow fragment) and religated. In a second step, the modified *Bam*HI fragment from pKG1022 was cloned into the single *Bam*HI cleavage site of the first cloning product. The miniantibody is derived from a single-chain ab fragment in which the variable domains in the V_H - V_L direction were connected to a flexible linker (gly₄ser)₃, followed by a proline-rich hinge region and a modified helix-turn-helix domain (dh1x) (Pack et al., 1993, *Biotechnol.* 11, 1271-1277). The DNA sequences, primers, amplifications and clonings of the light and heavy chain of murine/humanized Mab 425 are described in detail in WO 92/15683. In order to ensure secretion of the scFv425dh1x fragment into the periplasm, the V_H domain was fused N-terminally to the *pelB* signal sequence. The T7g10 ribosomal binding site (Shine Dalgarno) was cloned, using PCR methodology, into the *Xba*I and *Sfi*I cleavage sites of pEG1 (Strittmatter et al., 1995). The finally finished scFv425dh1x expression cassette was cloned between the *Xha*I and *Hind*III cleavage sites. This gave the expression vector pHKK which is depicted in Fig. 2.

Example 2:

The compositions of the media for the preliminary cultures in Erlenmeyer flasks, of the main

culture in a tank reactor equipped with an agitator mechanism (Biostat ED10, B. Braun, Biotech International, Melsungen, FRG), and of the feed media FS1, FS2 and FS3, are compiled in Table 1. The main
5 culture medium (8 l) was modified as compared with the medium of Riesenberget al., 1991 (see above). In order to prevent precipitations, the constituents were added in the sequence given in Tab. 1. Glucose and magnesium sulphate were added as separately autoclaved solutions.
10 The reactor was operated at 26°C, a pressure of 0.15 MPa, a pH of 6.8 and an average aeration rate of 10 l/min. 25% aqueous ammonia was used to adjust the pH. Ammonia and Ucolub N115® (Fragol Industrieschmierstoffe GmbH, Mühleim/Ruhr, FRG) were
15 added during the fermentation, by means of sensor control, in order to regulate the pH and as a defoaming agent, respectively. FS1 was prepared as follows: 750 g of glucose and 22.2 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ were dissolved separately in 600 ml of H_2O and 50 ml of H_2O ,
20 respectively. The solutions were mixed with each other after having been autoclaved. FS2 was prepared by dissolving 227 g of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and 169.5 g of $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ in water while at the same time adding 60 ml of 25% NH_3 in order to adjust the pH to 6.8 prior to autoclaving.
25 FS3 was prepared from stock solutions in the following sequence: 50 ml of Fe(III) citrate hydrate (6 g/l), 0.5 ml of H_3BO_3 (30 g/l), 0.5 ml of $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (10 g/l), 0.5 ml of EDTA $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (84 g/l), 0.5 ml of $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (15 g/l), 0.5 ml of $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (25 g/l), 0.5 ml of
30 $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (25 g/l) and 10 ml of $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4 g/l).

Example 3:

35 Several colonies from a Petri dish, where they had been grown on LB agar at 26°C, were used to overinoculate 20 ml of liquid LB medium. After 5 hours of shaking (200 rpm, 26°C), 1 ml was transferred to 100 ml of

preliminary culture medium in a 500 ml flask and the latter was then subjected to further incubation. 10 ml of this preliminary culture were used in order to overinoculate 100 ml of new preliminary culture medium.

- 5 In this way, 9 preliminary cultures were produced which were used together to overinoculate 8 l of main culture medium in the fermenter to an initial $OD_{550} \approx 0.2$.

Example 4:

- 10 The set-up of the 10 l bioreactor, together with accessories and control equipment, is depicted in Fig. 1. The culture on a high cell density fermentation scale was effected using a digital measuring and control unit (DCU), a multifermenter control system
15 (MFCS) and a gas flow control unit. CO_2 and oxygen release were measured constantly. Following overinoculation, the biosample collector MX-3 (New Brunswick Scientific, Watford, UK) was used for taking aseptic samples and permitting off-line data analysis
20 (Webb et al., 1990, Biotechnol. 8, 926-928). The control units maintained an admission gas flow rate of 10 l/min, a pH of 6.8, a temperature of 26°C and a pressure of 0.15 MPa. Two control loops guaranteed aerobic growth conditions at a pO_2 of 20%. All the
25 important physical quantities were displayed and recorded during the whole of the fermentation.

- During the fed-batch phase, the glucose concentration in the culture is maintained at 1.5 g/l. A modified flow injection analyser (FIAstar 5020
30 analyser equipped with a photometer and a detection control unit, Tecator AB, Sweden) was used for this purpose. Details of this system, and of its mode of operation, are described in the state of the art (e.g. Pfaff et al., 1995, in Munack A. and Schügerl K (eds):
35 Computer Applications in Biotechnology, Elsevier Science Ltd., Oxford, 6-11).

The cell density was calculated by measuring the optical density at 550 nm. The plasmid stability

was determined by the method of Pack et al., 1993 (see above).

Example 5:

5 The synthesized miniantibodies were determined quantitatively using the method of Pack et al., 1993 (see above). The quantity of functional miniantibodies was determined by ELISA and the total quantity of miniantibodies by SDS-PAGE in an 12% polyacrylamide
10 gel, in accordance with Laemmli (1970), followed by gel-scanning. For the ELISAs, microtitre plates were coated with human EGFR receptor (e.g. from WO 92/15683). The bound miniantibodies were detected with anti-scFv425 rabbit serum and peroxidase-conjugated
15 goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Inc., USA). The yield of active miniantibodies was calculated from dilution series prepared from the purified miniantibodies. In a control, it was demonstrated that the anti-scFv425 rabbit serum did not exhibit any
20 observable cross reaction with other components of the plasmid-free crude extract of E. coli RV308. Furthermore, addition of this crude extract to a dilution series prepared from the same antibody in purified form had no effect on the ELISA signals. In
25 order to determine the total quantity of miniantibodies, gels stained with Coomassie brilliant blue were detected photometrically and the concentration of the miniantibodies was calculated from a dilution series prepared from the purified
30 miniantibody which had been fractionated on the same gel. An analogous mixture in which E. coli host cells were used which did not produce any miniantibodies served as the control.

Patent claims:

1. Process for preparing foreign protein in E. coli cells which have been transformed with a plasmid carrying the foreign gene and an inducible promoter, by means of high cell density fermentation by way of batch and fed-batch stages, without any restriction of growth by substrates or metabolic by-products, and isolation and purification of the expressed protein from the culture medium, with the concentration of substrates in the fed-batch phase being controlled using a continuous, automated or semi-automated analysis and addition system, characterized in that, in the fed-batch phase, (i) the concentration of the carbon source in the medium is kept constant in a range between 0.1 g/l and 25 g/l while maintaining unlimited growth of the cells ($\mu = \mu_{max}$), (ii) the production of the foreign protein is started in the said fed-batch phase by inducing the promoter at a cell density of between 10 and 80 g/l, and (iii) utilizable nitrogen and phosphate, and also salts of trace elements, are fed in continuously after induction of product synthesis has taken place, with (iv) the pO_2 being adjusted to between 5 and 25% during the whole of the fed-batch phase by passing oxygen into the fermentation broth in an appropriate manner.
2. Process according to Claim 1, characterized in that the concentration of the carbon source is kept constant in a range between 1 and 3 g/l during the fed-batch phase.
3. Process according to Claim 1 or 2, characterized in that nitrogen, phosphate and trace elements are added at a cell density of between 50 and 80 g/l.
4. Process according to one of Claims 1 to 3, characterized in that the cell density according to (ii) of Claim 1 is from 20 to 60 g/l.

5. Process according to one of Claims 1 to 4, characterized in that cell densities of between 100 and 150 g/l can be achieved in the fed-batch phase.

6. Process according to one of Claims 1 to 5, characterized in that an expression vector is employed which possesses an expression cassette which contains the foreign gene and is flanked by two terminator sequences.

7. Process according to Claim 6, characterized in that the expression vector which is used additionally contains a suicide system, preferably the hok-sok suicide system.

8. Process according to Claim 6 or 7, characterized in that a foreign gene is employed which encodes an antibody fragment, in particular a miniantibody.

9. Process according to one of Claims 1 to 4, characterized in that an expression vector according to one of Claims 12-16 is employed.

10. Process according to one of Claims 1 to 9, characterized in that an E. coli strain is employed which, during the fermentation phase, accumulates not more than 5 g/l acetate in the culture medium.

11. Process according to Claim 10, characterized in that the E. coli strain RV308 (ATCC 31608) is employed.

12. E. coli expression vector, suitable for expressing foreign proteins under high cell density fermentation conditions, characterized in that it contains the following features:

(i) an upstream terminator sequence and a downstream terminator sequence,

(ii) the lac promoter/operator system,

(iii) a T7g10 Shine Dalgarno sequence,

(iv) the pelB or ompA signal sequence, and

(v) the sequence of the foreign gene.

13. Vector according to Claim 12, characterized in
5 that it additionally contains a suicide system, in particular the hok-sok suicide system sequence.

14. Vector according to Claim 12 or 13, characterized in that the upstream terminator sequence is t_{HP} and the downstream terminator sequence is t_{LPP} .

10 15. Vector according to one of Claims 12 to 14, characterized in that the foreign gene contains a sequence which encodes the V_H chain and the V_L chain of a miniantibody.

16. Expression vector having the designation pHKK
15 according to the construction scheme depicted in Fig. 2.

17. Transformed E. coli expression host
RV308[pHKK], which can be obtained by transforming
RV308 (ATCC 31608) with an expression vector according
20 to Claim 14.

- 2 -

Abstract:

The invention relates to a fed-batch fermentation process which uses special E. coli host/vector systems for the purpose of efficiently forming recombinant proteins, in particular recombinant antibody molecules, preferably antibody fragments such as miniantibodies.

Under the given conditions, the E. coli cells are able to grow at a maximum specific growth rate up to very high cell densities. After the recombinant product formation has been switched on, it is only the formed product which restricts growth; there is no growth restriction due to substrates or metabolic by-products. High space-time yields of recombinant proteins can be achieved in this manner.

Fig. 1

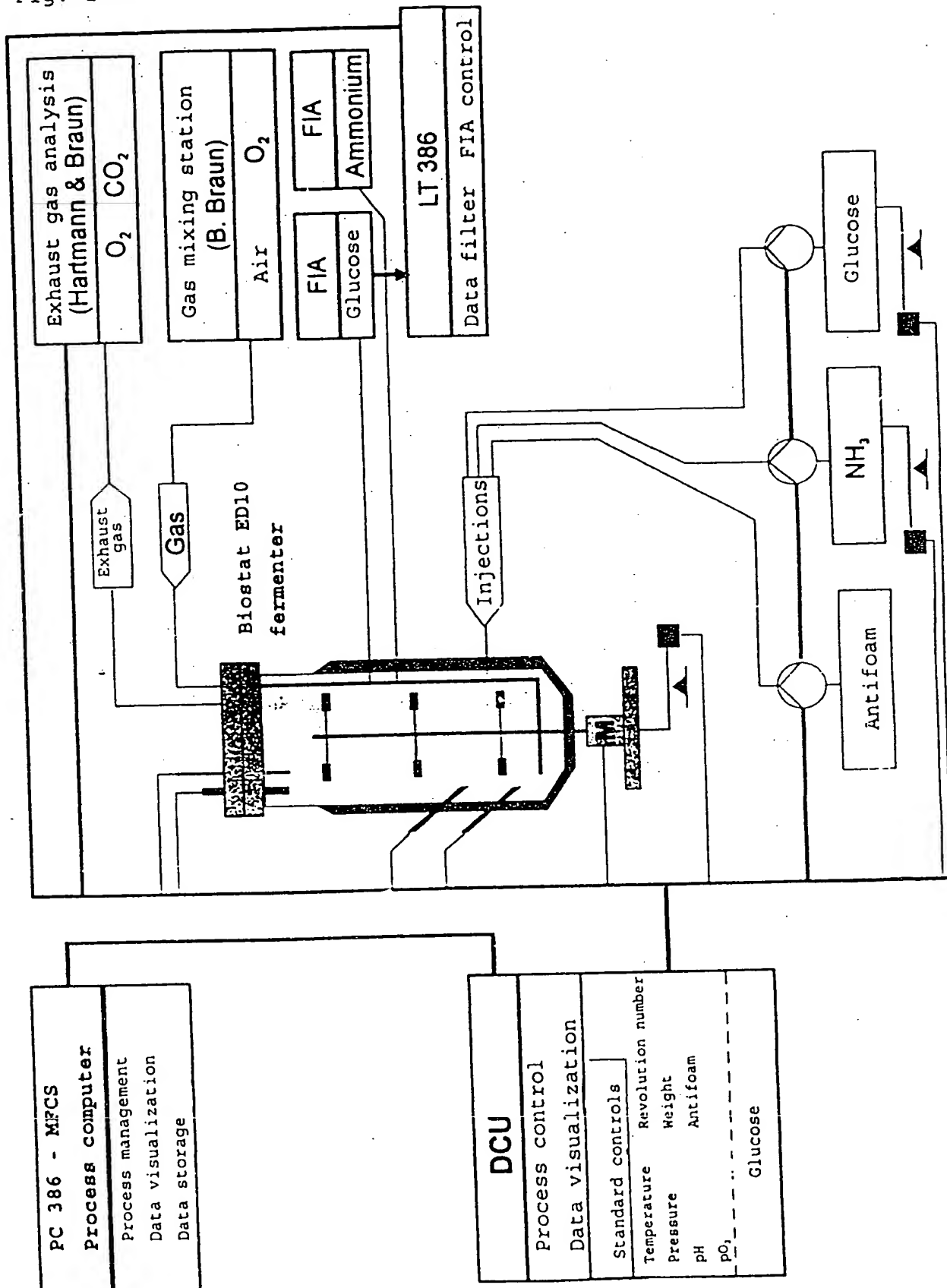


Fig. 2

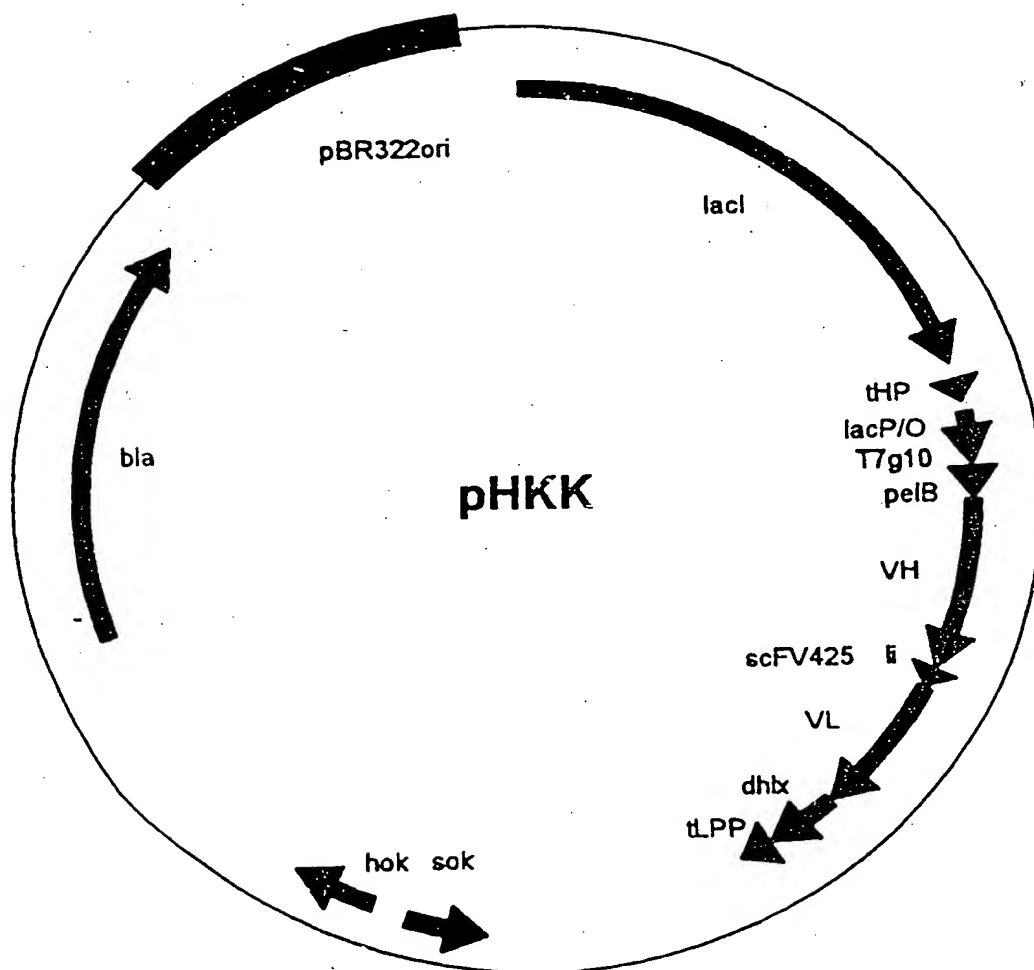


Fig. 3a

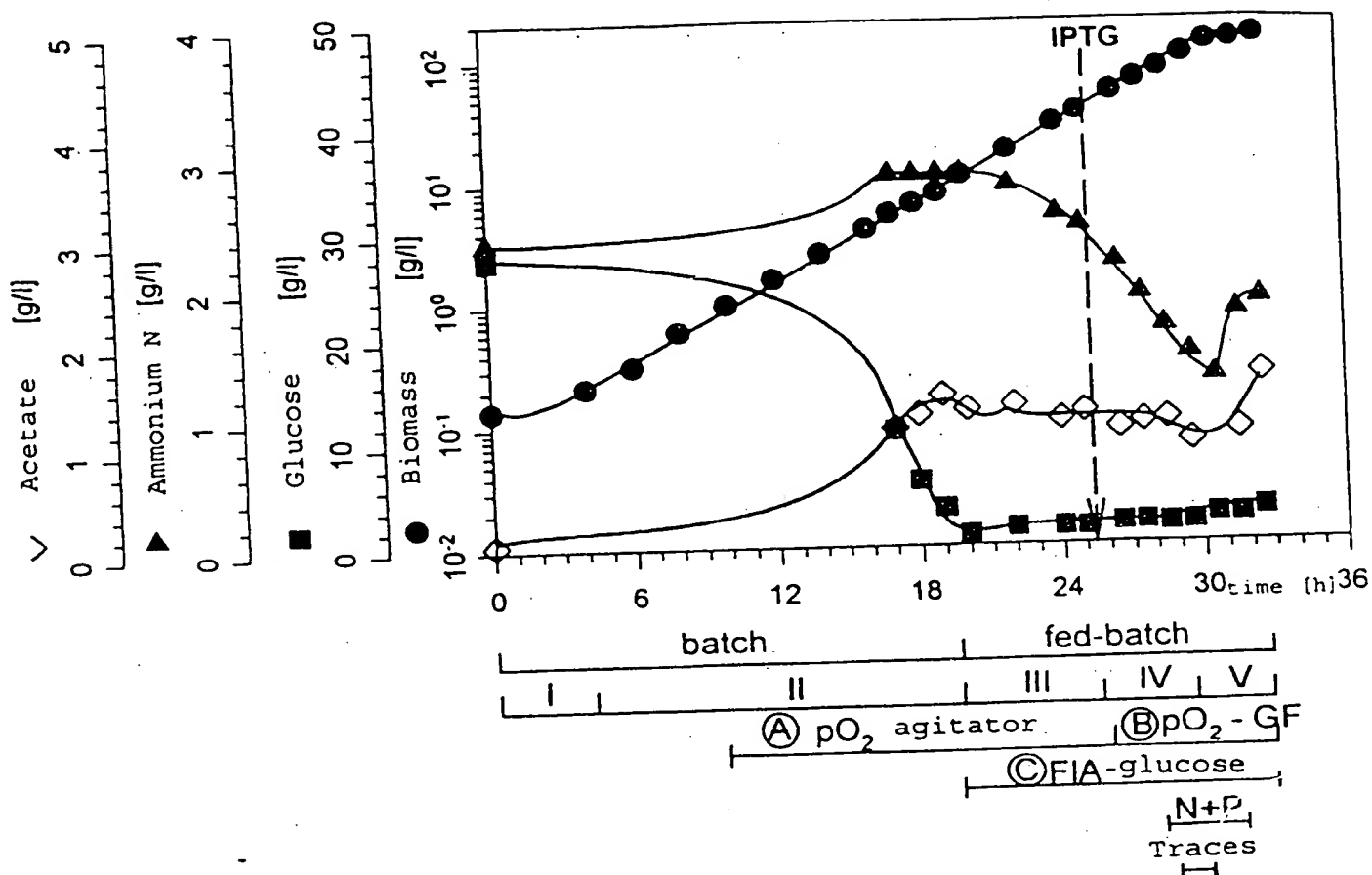
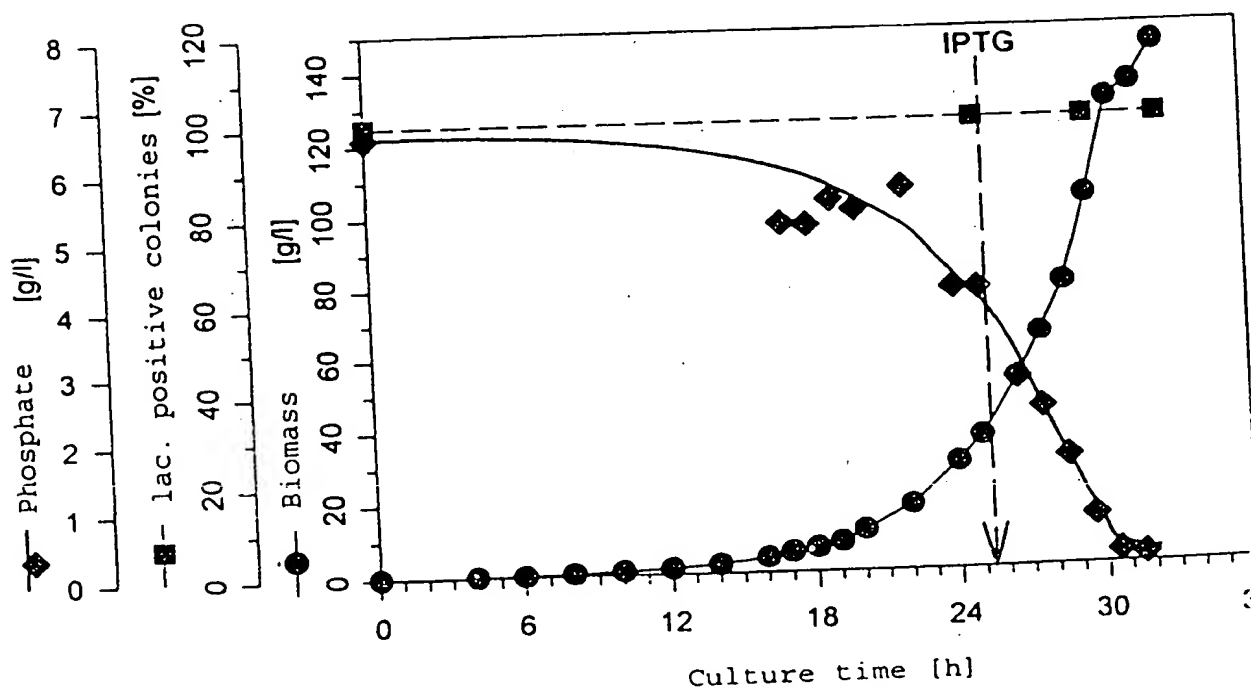
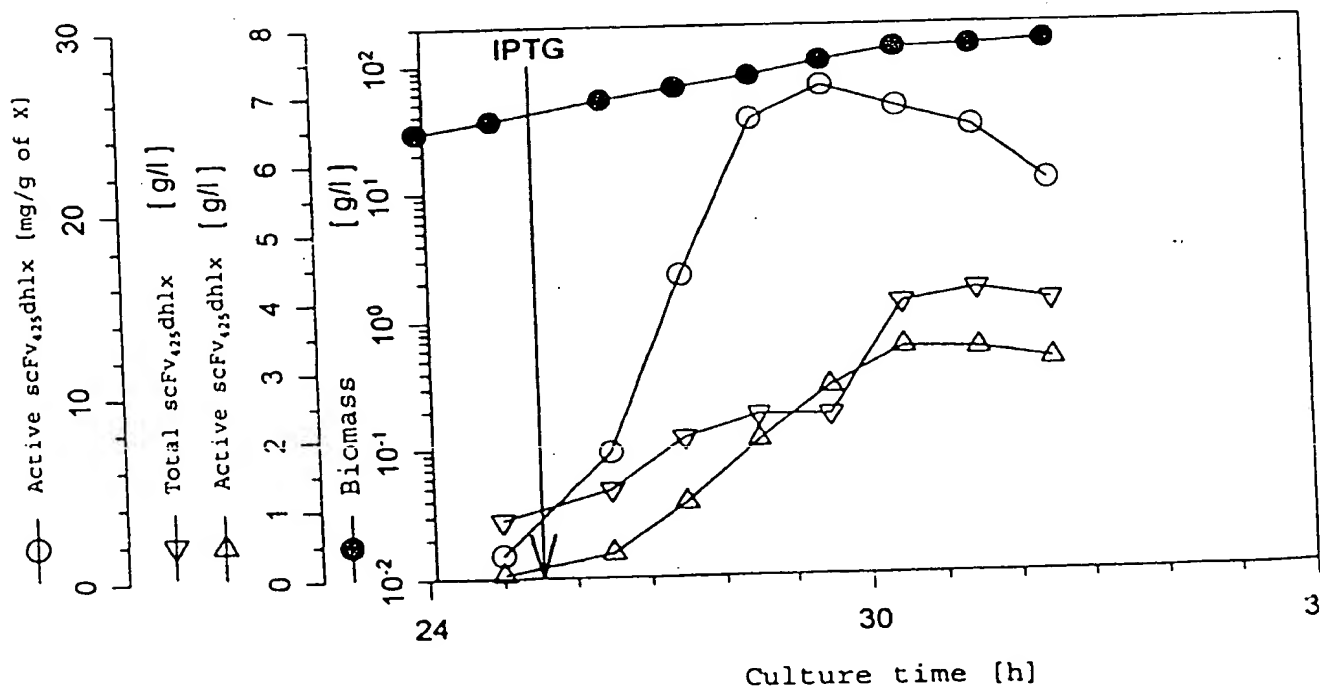
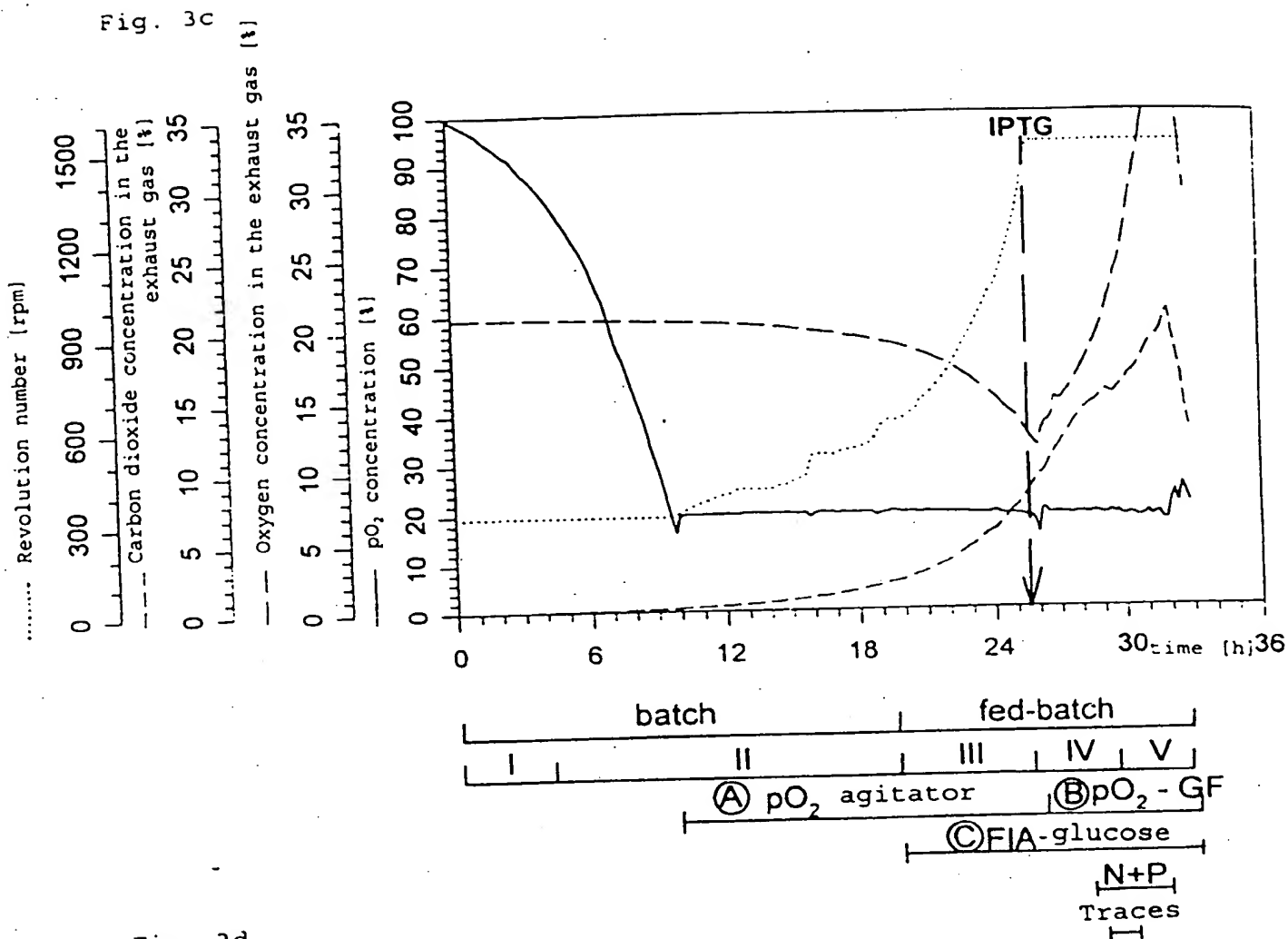


Fig. 3b





PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



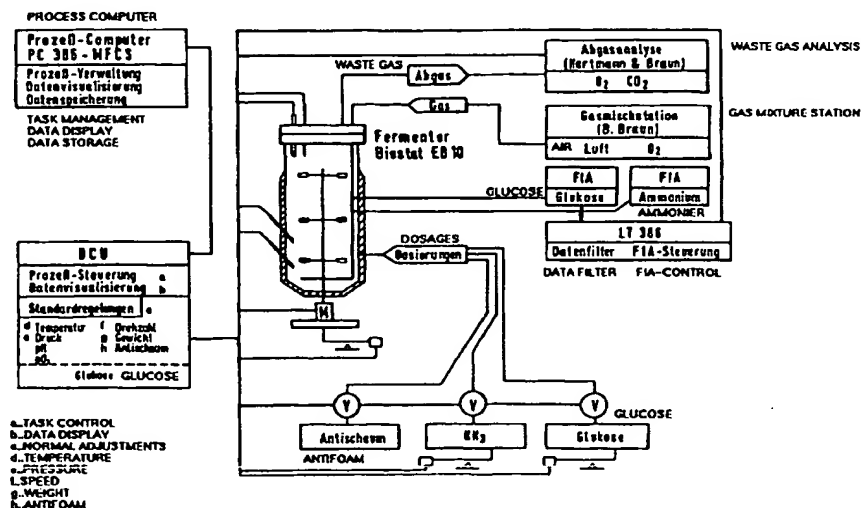
(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12P 21/02, C12N 15/72, 1/21, C07K 16/28 // (C12N 1/21, C12R 1:19)	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/21829 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. Juni 1997 (19.06.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/05260 (22) Internationales Anmeldedatum: 28. November 1996 (28.11.96) (30) Prioritätsdaten: 95119478.6 11. December 1995 (11.12.95) EP (34) Länder für die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: DE usw. (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STRITTMATTER, Wolfgang [DE/DE]; Neugasse 59, D-64372 Ober-Ramstadt (DE). MATZKU, Siegfried [DE/DE]; Wetzbach 24, D-64673 Zwingenberg (DE). RIESENBERG, Dieter [DE/DE]; Zenkerweg 3, D-07743 Jena (DE). HORN, Uwe [DE/DE]; Manniskestrasse 3, D-06567 Bad Frankenhausen (DE). KNÜPFER, Uwe [DE/DE]; Fritz-Ritter-Strasse 19, D-07747 Jena (DE). KUJAU, Marian [DE/DE]; Anna-Siemens-Strasse 55, D-07747 Jena (DE). WENDEROTH, Rolf [DE/DE]; Dorothea-Veit-Strasse 35, D-07747 Jena	(74) Gemeinsamer Vertreter: MERCK PATENT GMBH; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, CZ, HU, JP, KR, MX, NO, PL, RU, SK, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	

(54) Title: PROCESS FOR THE PREPARATION OF RECOMBINANT PROTEINS IN E.COLI BY HIGH CELL DENSITY FERMENTATION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON REKOMBINANTEN PROTEINEN IN E. COLI MITTELS HOCHZELLDICHTE-FERMENTATION

(57) Abstract

The invention relates to a fed-batch fermentation method with particular host-vector systems of *E. coli* for effective formation of recombinant proteins, in particular recombinant antibody molecules, preferably antibody fragments such as mini antibodies. In the conditions given the *E. coli* cells can grow at the maximum specific growth rate to very high cell densities. When recombinant product formation starts, only the product formed acts in a limiting manner on growth. Growth limitation by substrates or metabolic by-products does not occur. Consequently, large amounts of recombinant proteins can be produced in relation to space and time.



(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Fed-Batch Fermentationsverfahren mit speziellen Wirts-Vektor-Systemen von *E. coli* zur effektiven Bildung rekombinanter Proteine, insbesondere rekombinanter Antikörpermoleküle, vorzugsweise Antikörperfragmente wie Miniantikörper. Unter den gegebenen Bedingungen können die *E. coli*-Zellen mit maximaler spezifischer Wachstumsrate bis zu sehr hohen Zelldichten wachsen. Nach Anschaltung der rekombinanten Produktbildung wirkt nur das gebildete Produkt begrenzend auf das Wachstum; eine Wachstumsbegrenzung durch Substrate oder metabolische Nebenprodukte erfolgt nicht. Auf diese Weise können hohe Raum-Zeit-Ausbeuten an rekombinanten Proteinen erzielt werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LX	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen in *E. coli* mittels Hochzelldichte-Fermentation

5 Die Erfindung betrifft ein Fed-Batch Fermentationsverfahren mit speziellen Wirts-Vektor-Systemen von *E. coli* zur effektiven Bildung rekombinanter Proteine, insbesondere rekombinanter Antikörpermoleküle, insbesondere Antikörperfragmente, wie z.B. Miniantikörper.

10 Unter den erfindungsgemäßen Bedingungen können die *E. coli*-Zellen mit maximaler spezifischer Wachstumsrate bis zu sehr hohen Zelldichten wachsen. Nach Anschaltung der rekombinanten Produktbildung wirkt nur das gebildete Produkt begrenzend auf das Wachstum; eine Wachstumsbegrenzung
15 durch Substrate oder metabolische Nebenprodukte erfolgt nicht. Auf diese Weise und in Verbindung mit den speziell hierfür angepaßten und hohe Stabilität aufweisenden neuen Expressionvektoren können hohe Raum-Zeit-Ausbeuten an rekombinanten Proteinen erzielt werden, die insbesondere
20 im Fall von Antikörperfragmenten hohe biologische Aktivität aufweisen.

Eine wesentliche Voraussetzung für effektive rekombinante Proteinbildungen ist die Kultivierung von *E. coli* - Zellen zu hohen Zelldichten. Hierfür
25 sind folgende Kultivierungen Stand der Verfahrenstechnik: Nach unlimitiertem Wachstum ($\mu = \mu_{\max}$) in der Batch-Phase wird üblicherweise in der sich anschließenden Fed-Batch-Phase eine Kohlenstoffquelle (Glucose oder Glycerin) so begrenzt zudosiert, daß die Bildung von wachstumsinhibitorischen Nebenprodukten wie z.B. Acetat vermieden wird mit der Konsequenz,
30 daß das Wachstum dann bis zum Erreichen hoher Zelldichten nur substratlimitiert ($\mu < \mu_{\max}$) fortgesetzt werden kann (z.B. Riesenberg et al., 1991. J. Biotechnol., vol.20. 17-28; Strandberg et al. 1994. FEMS Microbiol. Rev., vol.14, 53-56; Korz et al. 1995. J. Biotechnol.39, 59-65; EP-B-0 511 226).
35 Wachstum mit reduzierter Wachstumsrate hat natürlich lange Fermentationszeiten.

tationszeiten und somit folglich auch geringere Raum-Zeit-Ausbeuten zur Folge. Bei diesen Fermentationen ist aufgrund des sofortigen Verbrauchs die Konzentration der Kohlenstoffquelle in der Kulturlösung nahezu Null. Nach
5 Anschaltung der rekombinanten Produktbildung ändert sich an den substratlimitierten Verhältnissen nichts.

Es sind auch Fed-Batch Kultivierungen mit *E. coli* bekannt, bei denen die Kohlenstoffquelle diskontinuierlich in größeren Zeitabständen und dann in
10 größeren Mengen zugegeben wird, wobei meist ein Anstieg des pO_2 -Wertes als Indikator für die Substraterschöpfung zur Initialisierung der folgenden Dosierung der C-Quelle verwendet wird (z.B. Eppstein et al. 1989. Biotechnol. 7, 1178-1181). Diese Verfahrensweise bedeutet einen häufigen Wechsel
15 von längerfristigen Substratüberschußbedingungen zu Substratlimitbedingungen und impliziert somit metabolische Imbalancen.

Im folgenden wird auf Fed-Batch Kultivierungen eingegangen, bei denen die Zellen in der Fed-Batch-Phase mit maximaler spezifischer Wachstumsrate
20 ($\mu = \mu_{max}$) wachsen können. Fed-Batch Kultivierungen, bei denen nach off-line Bestimmungen größere Mengen an C-Quelle in größeren Zeitabständen der Kultur zur Vermeidung von Substratlimitationen zugegeben werden, sind experimentell aufwendig und haben den Nachteil, daß sich
25 während der gesamten Fermentation die Konzentration der C-Quelle ständig ändert (z. B. Pack et al. 1993. Biotechnol., vol. 11, 1271-1277, Hahn et al. 1994. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42, 100-107).

Es sind auch Fed-Batch Kultivierungen beschrieben, bei denen die Konzentration der C-Quelle on-line gemessen und geregelt wird, sodaß Limitationen
30 vermieden werden, obwohl sie - insbesondere im Hochzelllichtbereich - mit den nachfolgend beschriebenen Nachteilen behaftet sind. Unlängst ist ein autoklavierbarer Glucose-Biosensor zum Einsatz in mikrobiellen Fermentationen in Rührkesselfermentern beschrieben worden (M. R. Phelps et al. 1995. Biotechnol. Bioeng., vol. 46, 514-524). Er wurde für *E. coli*-
35

Kulturen eingesetzt. Dieser in-situ-Sensor liefert in einer Zeitverzögerung von etwa 2 Minuten den aktuellen Wert in der Kulturlösung. Das vom Glucose-Sensor gelieferte Signal ist unter anderem pH- und pO_2 -abhängig. Im Hochzelllichtbereich $X > 80 \text{ g / l}$ ist der Sensor nicht erprobt. Erfahrungsgemäß können Bewachungen von in situ-Sonden mit *E. coli* bei sehr hohen Zelldichten zu weiteren Fehlwerten führen. Außerdem ist der Sensor während einer laufenden Fermentation nicht exakt rekalisrierbar. Andere Verfahren basieren nicht auf Messungen mit einem in situ-Sensor, sondern gründen sich z.B. auf der Bestimmung der Kohlenstoffquellen mittels on-line-Fließinjektions-Analysatoren (FIA) oder on-line-HPLC in zellfrei gemachter Kulturlösung, die aus dem Fermenter semikontinuierlich entnommen und einer Filtration oder Mikrozentrifugation unterworfen wird (Kleman et al. 1991. Appl. Environ. Microbiol. 57, 910-917 und 918-923; Turner et al. 1994. Biotechnol. Bioeng. 44, 819-829). Vorhersage- und Rückkopplungs-Kontrollalgorithmen verringerten die Schwankungen der Glucosekonzentration beim Wachstum bis $X = 65 \text{ g/l}$ (Kleman et al. 1991. Appl. Environ. Microbiol. vol. 57, 910-917.). Im Bereich sehr hoher Zelldichten (ab ca. 80 g / l bis 150 g / l) wird die Separation von Zellen und Nährlösung zunehmend schwieriger und zeitaufwendiger, so daß auch die Zeitverzögerung zur Bestimmung des aktuellen Glucosewertes im Fermenter biomasseabhängig zunimmt und die Konstanthaltung des Glucosespiegels erschwert bzw. unmöglich macht. Mit konstanter und kurzer Zeitverzögerung dagegen wird die Glucosekonzentration gemessen bei einer Apparatur, die auf diese Zellseparation verzichtet (Pfaff et al. 1995. p. 6-11. In: Proceedings of the 6th International Conference on Computer Appl. in Biotechnol. Garmisch-Partenkirchen, FRG). Nach Pfaff et al. wird in unmittelbarer Nähe der Probenahmeestelle nach Verdünnung der Kultur mit einem Wachstumsinhibitor eine FIA mit enzymatisch-amperimetrischem Glucose-sensor zum Einsatz gebracht.

Bei der aeroben Kultivierung bilden *E. coli*-Zellen, die nicht durch Dosierungsregime zum substratlimitierten Wachstum gezwungen werden, üblicherweise verstärkt das metabolische Nebenprodukt Acetat (Riesenberg
5 1991. Curr. Opinion Biotechnol., vol. 2, 380-384.), das sich in der Nährlösung akkumuliert und in größeren Mengen wachstumsinhibitorisch wirkt (Pan et al. 1987. Biotechnol. Lett., vol. 2, 89-94). Deshalb sind bisher diese Fed-Batch-Kultivierungen zu hohen Zelldichten nur mit besonderen *E. coli*-
10 Stämmen möglich, deren Acetat-Akkumulation durch gezielte genetische Veränderungen reduziert wurde bei Tolerierung anderer damit verbundener Nachteile. Zu den Abkömmlingen von *E. coli* K12 gehören phosphotransacetylase-negative Mutanten (Bauer et al. 1990. Appl. Environ. Microbiol., vol.
15 56, 1296-1302; Hahm et al. 1994. Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 42, 100-107.), die jedoch in Glucose-Mineralsalzmedien stark im Wachstum reduziert sind. Phelps und Mitarbeiter (s.o.) verwendeten als Wirt den *E. coli* Stamm TOPP5 für die nicht substratlimitierte Kultivierung bis zu einer
20 Biomasse von $X = 85$ g/l. Dieser *E. coli* Stamm, der offenbar nicht stark Acetat akkumuliert, ist jedoch kein K-12 Stamm. *E. coli* TOPP5 bildet Hämolysin und ist somit ein pathogener Stamm, der aus Sicherheitsgründen nicht als Wirt für die Bildung rekombinanter DNA-Produkte im Industriesektor in Frage kommt. Durch Transformation von *E. coli*-Zellen mit einem
25 Plasmid, das ein Gen zur Codierung von Acetolactatsynthase (ALS) enthält, konnte durch gezielte Reorientierung des intermediären Stoffwechsels eine Reduktion der Acetatakkumulation erzielt werden (San et al. 1994. In: Ann-N-Y-Acad-Sci, vol. 721, 257-267). Diese Verfahrensweise ist aber mit dem
30 Nachteil behaftet, daß bei Verwendung eines ALS-codierenden Plasmides in Kombination mit einem zweiten, das "Produktions"-Gen tragenden Plasmids unter Hochzelldichtebedingungen üblicherweise Instabilitäten auftreten. Durch Plasmidinstabilitäten, die insbesondere bei der Kultivierung zu sehr
35

hohen Zelldichten verstärkt auftreten, wird die Effizienz von rekombinanten Produktbildungen häufig verringert.

Antikörper oder Antikörperfragmente, wie Fab', F(ab')₂, Miniantikörper oder
5 single-chain Fv's, erlangen im zunehmenden Ausmaß Bedeutung im medizinischen und biotechnischen Bereich. Unter Miniantikörper ist im folgenden erfindungsgemäß ein bivalenter oder bispezifischer über pseudo-Hinge-Region verknüpftes single-chain Fv-Fragment zu verstehen. Dabei kann es
10 wichtig werden, wie zum Beispiel in der Krebstherapie, große Mengen an Antikörpern (etwa 1 g / Dosis) zur Verfügung zu stellen. In *E. coli* können nun besonders leicht und gut monovalente Antikörperfragmente oder Fusionsproteine von diesen, bzw. multimeren oder multispezifischen Varianten
15 davon, hergestellt werden. Diese Fragmente bzw. Varianten weisen eine kleine Größe verbunden mit einer hohen spezifischen Bindungsfähigkeit auf. (z.B. Plückthun A., 1992, Immunol. Rev. 130, 151-188; Pack et al, 1995, J. Mol. Biol. 246, 28-34). Proteine und insbesondere Antikörper müssen aber
20 richtig gefaltet sein, um biologisch und funktionell wirksam zu sein. Dieses Problem muß bei der Ausbeutebetrachtung von gebildetem Antikörperfragment pro Zelle in Zusammenhang mit der Zelldichte beachtet werden. Ferner spielt die Primärsequenz des Antikörpers eine wichtige Rolle bei der
25 Bestimmung der Ausbeute *in vitro* und der Faltung *in vivo* (Knappik A. und Plückthun A., 1995, Protein Engin. 8, 81-89). So werden z.B. Fab-Fragmente als unlösliche cytoplasmatische oder periplasmatische Aggregate exprimiert und *in vitro* rückgefaltet. So wird über Ausbeuten von etwa 0.14
30 g / l bei niedriger Zelldichte (Condra et al., 1990, J. Biol. Chem. 265, 2292-2295) und bis etwa 1-2 g / l unlöslicher Antikörper bei mittlerer Zelldichte (Shibui et al, 1993, Appl. Microbiol. Biotechnol. 38, 770-775) berichtet. Auch bivalente Miniantikörper (Pack et al., 1993, Biotechnol. 11, 1993, 1271-1277) können in biologisch-funktioneller Form in Ausbeuten von etwa
35

0.2 g / l in *E. coli* erhalten werden. Durchschnittlich sind bei diesen Ausbeuten ca. 5 - 45 % ordnungsgemäß rückgefaltet.

5 In den bekannten *E. coli*-Systemen wird die Fremdprotein-Bildung in der Regel auf geeignete Weise nach Erreichen angemessener Zelldichten entsprechend dem Expressionssystem durch ein regulierbares Promotorsystem angeschaltet. Hier sind beispielsweise zu nennen (i) der *araBAD* Promoter in Gegenwart des *AraC* Repressors (induzierbar durch Arabinose) (z.B. Better
10 et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90, 457-461), (ii) der *phoA*-Promoter (induzierbar durch Phosphat-Entzug) (z.B. Carter et al, 1992, Biotechnol. 10, 163-167), und (iii) das *lac*-Promotorsystem (induzierbar durch IPTG) (Pack et al, 1993, l.c.). Das *lac*-System, das in der Regel eine
15 gute Expression bewirkt, hat aber den Nachteil, daß einerseits eine unerwünschte Grundexpression vor Induktion des Promoters und andererseits eine Plasmidinstabilität nach Induktion mit IPTG zu beobachten ist.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird ein spezieller
20 Vektor (pHKK) beschrieben, der als Fremdgen Sequenzen enthält, die für Fragmente des murinen bzw. humanisierten Antikörpers MAb 425 codieren. MAb 425 (ATCC HB 9629) ist ein muriner monoklonaler Antikörper, der aus der bekannte menschlichen A432 Krebszelllinie (ATCC CRL 1555)
25 isoliert wurde und an das Epitop des humanen epidermischen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR, ein Glycoprotein von etwa 170 kD) bindet unter Inhibierung der Bindung des natürlichen Liganden EGF. Es ist gezeigt worden, daß MAb 425 cytotoxische Wirkung auf Tumorzellen hat, bzw. diese
30 am Wachstum zu hindern vermag (Rodeck et al., *Cancer Res.* 1987. 47: 3692). Aus der WO 92/15683 sind humanisierte sowie chimere Formen des MAb 425 bekannt, einschließlich der DNA- und Aminosäuresequenzen ihrer leichten und schweren Ketten.

35

Ziel der Erfindung war es nun, ein Verfahren zur Herstellung von Fremdproteinen, insbesondere Antikörperfragmenten, in rekombinanten *E. coli*- Zellen unter Hochzell-dichte-Bedingungen (HCDC = High Cell Density Culture) mit hohen Raum-Zeit-Ausbeuten und ohne wesentliche Wachstumsbeeinträchtigung durch Substrate oder Metaboliten und ohne nennenswerte Plasmidverluste, bzw. Plasmidinstabilitäten unter Gewährleistung eines großen Prozentsatzes an wirksamer biologischer Aktivität (Bindungsfähigkeit, korrekte Faltung) des exprimierten Proteins zur Verfügung zu stellen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist ein mehrstufiges Batch-Verfahren, daß sich in erster Linie dadurch auszeichnet, daß die Zellen während des gesamten Batches maximal wachsen können ($\mu = \mu_{\max}$). So können mit dem beschriebenen Verfahren letztlich Zelldichten von 100 bis 150 g / l (Bio-trockenmasse) erreicht werden. Das Wachstum wird auch nicht wesentlich durch Acetat-Akkumulation inhibiert, da eine solche unter den gewählten Bedingungen überraschenderweise nicht besonders ausgeprägt ist, insbesondere bei Verwendung von *E. Coli*- Stämmen, die ohnedies nur zu verminderter Acetatbildung während der Fermentation neigen. Dies wird auch unter einer Reihe anderer zusätzlicher Maßnahmen vorallem dadurch erreicht, daß in der einer Batch-Phase nachgeschalteten Fed-Batch-Phase die Konzentration der Kohlenstoffquelle im Medium in einem definierten Bereich unter Beibehaltung von unlimitiertem Wachstum der Zellen konstant gehalten wird. Durch entsprechende Gestaltung des entsprechenden Expressionsvektors kann auch die unerwünschte Basalexpression von Protein vor Anschaltung der Proteinsynthese durch ein regulierbares Promotersystem nahezu ausgeschaltet werden, ebenso wie der zum Teil erhebliche Plasmidverlust, der, wie oben bereits erwähnt, normalerweise in Expressionssystemen mit starken Promotern wie z.B. das *lac*-Promotersystem, zu beobachten ist.

Es können durchschnittlich Proteinausbeuten von 3 bis 5 g / l nach ca. 25 bis 35 Stunden Gesamtkultivierung erreicht werden. Im Falle der wegen ihrer Faltungskriterien besonders kritischen Antikörperfragmente, insbesondere Miniantikörper, sind etwa 80 % des synthetisierten Materials biologisch
5 aktiv und korrekt gefaltet.

Gegenstand der Erfindung ist somit Verfahren zur Herstellung von Fremdprotein in *E. coli*- Zellen, die mit einem das Fremdgen und einen induzierbaren Promoter tragenden Plasmid transformiert wurden, mittels
10 Hochzelldichtefermentation über Batch- und Fed-Batch Stufen ohne jegliche Wachstumsbegrenzung durch Substrate oder metabolische Nebenprodukte, und Isolierung und Aufreinigung des exprimierten Proteins aus dem Kulturmedium, wobei die Konzentration an Substraten in der Fed-Batch Phase
15 über ein kontinuierliches automatisches oder semi-automatisches Analyse- und Zugabesystem gesteuert wird, wobei in der Fed-Batch Phase (i) die Konzentration der Kohlenstoffquelle im Medium in einem Bereich zwischen 0.1 g / l und 25 g / l unter Beibehaltung von unlimitiertem Wachstum
20 der Zellen ($\mu = \mu_{\max}$) konstant gehalten wird, (ii) die Produktion des Fremdproteins innerhalb besagter Fed-Batch-Phase bei einer Zelldichte zwischen 10 und 80 g / l durch Induktion des Promoters gestartet wird, und (iii)
25 nach erfolgter Produktsynthese-Induktion verwertbarer Stickstoff und Phosphat sowie Salze von Spurenelementen kontinuierlich zugefüttert werden, wobei (iv) während der gesamten Fed-Batch Phase der pO_2 -Wert durch entsprechende Sauerstoffeinleitung in die Fermentationsbrühe zwischen 5 und
30 25 % eingestellt wird.

Die erfindungsgemäßen Werte für die erforderliche Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Fed-Batch-Phase liegt in einem Bereich zwischen 0.1 g bis 25 g / l. Ein bevorzugter Bereich liegt zwischen 0.5 und 15 g
35 / l, insbesondere zwischen 1.0 bis 5 g / l, bzw. zwischen 1.0 bis 3 g / l. Die besonders bevorzugte Konzentration ist 1.5 g / l. Als Kohlenstoffquelle sind

vorzugsweise Glucose oder Glycerin oder Gemische aus beiden zu nennen. Erfindungsgemäß erfolgt die Zugabe der Kohlenstoffquelle mittels eines automatischen oder halbautomatischen Zugabe- und Analysesystems in kontinuierlicher Weise (on-line). Vorzugsweise wird ein on-line Fließinjektionsanalyse-System (FIA) eingesetzt.

Die Zufütterung von verwertbarem Stickstoff, vorzugsweise Ammonium-Stickstoff und Phosphat, beispielsweise Diammoniumhydrogenphosphat oder Ammoniumdihydrogenphosphat, sowie Spurenelementen, beispielsweise im Medium lösliche Salze von Bor, Mangan, Kupfer, Molybdän und Kobalt Eisen oder Zink, erfolgt in der der Batch-Phase nachgeschalteten Fed-Batch-Phase, vorzugsweise nach Anschaltung der Proteinsynthese durch den regulierbaren Promoter bei einer Zelldichte von 50 bis 80 g / l (Biotrockenmasse), vorzugsweise bei etwa 70 g / l bei einer Gesamtwachstumsrate von 100 bis 150, vorzugsweise 140 g / l.

Das Anschalten der Proteinsynthese durch Aktivierung des regulierbaren Promotersystems erfolgt erfindungsgemäß bei einer Zelldichte von 10 bis 80 g / l, vorzugsweise zwischen 20 bis 60 g / l; ganz besonders bevorzugt ist der Bereich von 40 bis 50 g / l.

Der Partialsaurestoffdruck liegt während der Fed-Batch-Phase zwischen 5 und 25%, vorzugsweise zwischen 15 und 25%, ganz besonders bevorzugt bei 20 %.

Der pH-Wert des Fermentationsmediums ist erfindungsgemäß während des gesamten Batches zwischen 6.5 und 7.0, vorzugsweise zwischen 6.7 und 6.9, insbesondere bei 6.8, einzustellen.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein entsprechendes Verfahren bei dem ein Expressionsvektor mit einer von zwei Terminatorsequenzen flankierten das Fremgen enthaltenden Expressionskassette eingesetzt wird. Diese Terminator-Sequenzen, insbesondere die "upstream" positionierte, verhindern er-

folgreich eine unerwünschte Expression von Protein vor der Anschaltung durch das Promotersystem. Besonders geeignet ist der Terminator t_{hp} (Nohno et al., 1988, J. Bacteriol. 170, 4097-4102) aber auch andere bekannte Terminator-Sequenzen können eingesetzt werden.

Weiterhin ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren, bei dem der verwendete Expressionsvektor zusätzlich ein Suizidsystem enthält. Das Suizidsystem produziert ein Protein, welches ohne das Vorhandensein des Plasmids in der Zelle für diese toxisch ist. Geeignete Suizidsysteme sind in der Literatur bekannt. Ein für die Erfindung besonders geeignetes Suizidsystem ist das *hok-sok*-System (z. B. Gerdes K., 1988, Biotechnol. 6, 1402-1405). Für das Verfahren zur effektiven Bildung rekombinanter Proteine, insbesondere von Antikörpermolekülen, ist es nämlich wichtig, daß das Wirtsvektor-System sich im Hochzelldichtebereich durch eine hohe Plasmidstabilität, geringe rekombinante Basalexpression und hohe Produktbildung auszeichnet. Suizid-Systeme in Kombination mit rekombinanten, durch Terminatoren flankierten Expressionskassetten sind dabei vektorspezifisch.

Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein entsprechendes Verfahren, bei dem ein Fremdgen eingesetzt wird, das für ein Antikörperfragment, insbesondere einen Miniantikörper codiert

Weiter ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren, bei dem Expressionsvektoren mit zusätzlichen, unten beschriebenen Merkmalen eingesetzt werden.

Prinzipiell sind die meisten bekannten, für die Rekombinationstechnik und für die Produktion im technischen Maßstab geeigneten *E. coli*- Stämme einsetzbar. Vorteilhafterweise finden solche Stämme bevorzugte Verwendung, die bei Wachstum zu hohen Zelldichten relativ wenig Acetat akkumulieren. Besonders geeignet sind Stämme, die eine Acetatanreicherung von unterhalb 5 g / l aufweisen. Überraschenderweise kann durch die gewählten Bedingungen des erfindungsgemäßen Verfahrens die Acetatakkumulation beson-

ders tief gehalten werden. Besonders geeignet in dieser Hinsicht ist der allgemein bekannte und käuflich erhältliche *E. coli*-Stamm RV308 (ATCC 31608) sowie seine wirkungsgleichen Varianten.

5 Gegenstand der Erfindung ist so insbesondere ein entsprechendes Verfahren, bei dem ein *E. coli*-Stamm mit einer Acetat-Akkumulation von unter 5 g / l im Kulturmedium während der Fermentation eingesetzt wird.

10 Gegenstand der Erfindung ist außerdem ein *E. coli*-Expressionsvektor, geeignet für die Expression von Fremdproteinen unter Hochzelllichtfermentations-Bedingungen, der folgende Merkmale aufweist:

- (i) eine „upstream“- und eine „downstream“- Terminatorsequenz,
- 15 (ii) das lac Promoter/Operatorsystem,
- (iii) T7g10- Shine Delgarno-Sequenz,
- (iv) die pelB- oder ompA-Signalsequenz,
- (v) die Sequenz des Fremdgens,
- 20 und in einer bevorzugten Ausführungsform zusätzlich, ein Suizidsystem, insbesondere das *hok-sok*-Suizidsystem.

25 Erfindungsgemäß kann das Promotersystem auch durch andere geeignete, beispielsweise oben genannte Systeme ersetzt werden. Ebenso werden von der Erfindung auch andere gleichwirkende Signal-und Steuerungssequenzen umfaßt.

30 Als spezielle Ausführungsformen sind letztlich Gegenstand der Erfindung der durch seine Konstruktion definierte Expressionsvektor pHKK (Abb. 2), der die Sequenzen für den Miniantikörper, welcher sich aus MA b 425 ableitet, enthält, sowie ein spezieller rekombinater *E. coli*-Wirt RV308[pHKK].

35

Beschreibung der Abbildungen:

5 **Abb. 1:** Experimenteller Versuchsaufbau des Bioreaktors zur Herstellung von Proteinen unter Hochzell-dichte-Bedingungen. Das System ist mit einer Meß-, Anzeige-, Kontroll- und Dosierungsvorrichtung ausgestattet.

10 **Abb. 2:** Optimierter Expressionvektor pHKK sowie Teilstücke seiner Konstruktion. Der Vektor setzt sich im wesentlichen aus Teilstücken der bekannten Vektoren pASK40, pAK100 und pKG1022 zusammen.

15 **Abb. 3(a-d):** HCD-Kultivierung von rekombinanten *E. coli* am Beispiel von *E. coli* RV308[pHKK]: zeitlicher Verlauf von Biomasse, Glucose, Ammonium-Stickstoff, Phosphat, Acetat, Rührergeschwindigkeit, pO₂, O₂ und CO₂ im Abgas, Plasmidstabilität (ausgedrückt durch % von β -lactamase-positive Kolonien) und Bildung von Protein (hier: scFv_{425dhlx}). Die Batch- und Fed-Batch-Phasen sind in 5 Subphasen unterteilt. Der IPTG-Pfeil gibt den Start der Proteinproduktion an.

20

25 Das erfindungsgemäße Verfahren verwendet transformierte *E. coli*- Wirtszellen. Die ausgewählten Plasmidkonstruktionen richten sich nach der Art des zu exprimierenden Proteins. Besonders günstige Merkmale solcher Plasmidkonstruktionen werden weiter unten beschrieben. Die für die Plasmid-Konstruktion und die Wirtszellen-Transformation erforderlichen Techniken und Methoden sind allesamt bekannt und in der Literatur ausführlich beschrieben (z.B. Sambrook et al, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor). Sie sind zudem anhand der besonderen Ausführungsformen der Erfindung in den Beispielen dargelegt. Ausgangsplas-

30

35

mide oder Plasmidteile sind entweder käuflich erhältlich oder können nach Standardmethoden auf Basis von bekannten Konstruktionsschemata ohne weiteres konstruiert werden.

5

Die vorangeschaltete Batch-Phase einer typischen erfindungsgemäßen Fermentation von transformierten *E. coli* Zellen ist in zwei Subphasen unterteilt. Nach Animpfung mit einer entsprechenden Vorkultur ist Subphase I gekennzeichnet durch eine Lag-Phase, in der sich die Zellen adaptieren und die Wachstumsrate μ anschließend auf μ_{\max} ansteigt. Während der Subphase II wachsen die Zellen exponentiell bei $\mu = \mu_{\max}$. Nach einem Abfall von pO_2 von 100% Sättigung auf unter 5-15 % wird der pO_2 -Wert durch Kontrollieren der Geschwindigkeit des pO_2 -Rührers auf vorzugsweise auf pO_2 -Werte zwischen 15 bis 25%, insbesondere um 20 % eingestellt (Abb. 3c). Diese Einstellung (durch Einleiten von mit reinem Sauerstoff angereicherter Luft) sollte etwa nach 6 bis 12 Stunden nach Beginn der Fermentation der Hauptkultur vorgenommen werden. Die Glucose-Konzentration, die anfänglich vorzugsweise zwischen 20 bis 35 g / l gelegen ist, sinkt bis zum Ende der Subphase II, welche auch das Ende der der Fed-Batch-Phase vorangeschalteten Batch-Phase darstellt, ab. Dabei sollten Werte von 0.1 g / l auf keinen Fall unterschritten werden. Dies wird von nun an verhindert durch entsprechendes Zufüttern von Glucose (Subphase III, Abb. 3a, Start der Fed-Batch-Phase). Erfindungsgemäß wird der Glucosewert zwischen 0.1 und 25 g / l, vorzugsweise aber zwischen 1 und 3 g / l konstant gehalten werden. Hierzu kann beispielsweise das Zufütterungsmedium FS1 (Tab. 1) verwendet werden. Da dieser Glucose-Konzentrationsbereich weit genug über dem K_s -Wert für Glucose liegt (Bergter, 1983, "Wachstum von Mikroorganismen", S. 41, Gustav Fischer Verlag, Jena), können die Zellen weiterhin bei μ_{\max} wachsen. Die Kontrolle und Regelung der Glucosekonzentration erfolgt erfindungsgemäß mit einem automatischen oder halbautomatischen System.

Besonders geeignet sind Fließinjektionsanalysator-Systeme im on-line-Betrieb. Rein manuelle oder weitgehend manuelle Systeme haben sich als ungünstig erwiesen. Die Fed-Batch-Phase beginnt etwa zwischen der 15. und 22. Stunde, hängt aber letztlich von verschiedenen individuellen Faktoren wie Temperatur, Medienzusammensetzung und -Konzentration, Reaktorgröße usw. ab, insbesondere aber auch von der Art des verwendeten *E. coli*-Stammes. Vorteilhafterweise erfolgt etwa 4 bis 8 Stunden nach Beginn der Fed-Batch-Phase das Anschalten der Synthese des Fremdproteins. Der genaue Zeitpunkt richtet sich aber letztlich nach der zu diesem Zeitpunkt bereits erreichten Zelldichte der Kultur. Zelldichten zwischen 10 und 80 g / l, vorzugsweise zwischen 20 und 60 g / l sind besonders günstig, falls finale Zelldichten von 100 bis 150 g / l erreicht werden können. Allgemein günstig für das Starten der Proteinsynthese ist es somit, wenn etwa 10 bis 60 % der maximal zu erreichenden Zelldichte zum Induktionszeitpunkt vorliegen.

Die Proteinsynthese wird durch Anschalten des regulierbaren Promotersystems bewirkt. Dieses Anschalten erfolgt je nach verwendetem System in der Regel durch Zugabe einer Substanz oder durch Veränderung einer physikalischen Größe. Im Falle des bevorzugten lac-Systems (Promoter, Operator, Induktor) durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-thio-galactopyranosid). Das weitere Wachstum der Zellen ist jetzt nur noch durch das sich akkumulierende Produkt begrenzt. Deshalb ist es erfindungsgemäß wichtig, daß vor Induktion keine nennenswerte Basalexpression stattfinden kann, die auf das Gesamtwachstum und damit auf die Gesamtausbeute einen ungünstigen Einfluß ausüben würde. Dies wird erfindungsgemäß dadurch bewerkstelligt, daß die Expressionskassette in dem Plasmid von wirksamen Terminatorsequenzen flankiert wird.

Ab dem Zeitpunkt der Glucose-Zufütterung verarmt das Fermentationsmedium an Stickstoff und Phosphat (Abb. 3a,b). Um Limitationen jeglicher Art zu vermeiden, wird Stickstoff und Phosphat vorzugsweise ebenfalls über ein

entsprechendes kontinuierliches Verfahren zugefüttert. Stickstoff wird zweckmäßigerweise in Form von Ammoniumsalzen zugeführt, da hierdurch gleichzeitig auch auf den pH-Wert Einfluß genommen werden kann (6.5 bis 7.0, vorzugsweise 6.8). Beispielsweise eignet sich die Lösung FS2 (Tab. 1).
5 Subphase IV ist gekennzeichnet durch erfindungsgemäßer Zuführung von Spurenelementen (z.B. Bor, Mangan, Eisen, Cobalt, Molybdän, Zinn) in Form ihrer löslichen Salze. Die Zugabe erfolgt in der Regel kontinuierlich mit einer konstanten Rate. Subphase V ist gekennzeichnet durch ein vermindertes Wachstum, in erster Linie bedingt durch Produktakkumulation. Außerdem ist ein geringfügiges Ansteigen der Acetatkonzentration zu beobachten. Dennoch ist die Acetatakkumulation bzw. -Konzentration im Medium überraschend niedrig. Dies ist auch auf die speziellen Verfahrensbedingungen zurückzuführen. *E. coli*-Stämme mit einer maximalen Acetatanreicherung von < 5 g / l während der Fermentation verstärken diesen Effekt noch deutlich.
10
15

20 Die Ausbeuten an Protein variieren je nach Art des Proteins durchschnittlich zwischen 2 und 6 g / l. Davon sind, wiederum je nach Art des Proteins, zwischen 50 und 95 % biologisch aktiv. Im Falle von Antikörperfragmenten erhält man über 80 % rückgefaltetes Protein. Diese Werte übersteigen deutlich die bisher im Stand der Technik beschriebenen vergleichbaren Verfahren.
25

Vorzugsweise können mit dem geschilderten Verfahren unter Einbezug der speziell hierfür konstruierten und angepaßten Expressionsplasmide Antikörperfragmente, insbesondere Miniantikörper, effektiv hergestellt werden. Aber auch die Herstellung vieler anderer Proteine, Fusionsproteine oder Enzyme ist gemäß des erfindungsgemäßen Verfahrens in vorteilhafter Weise möglich. Beispiele für solche geeigneten Proteine sind Hybridstreptokinase, Glucosedehydrogenase oder auch Proteine, die Wirkung auf die Blutgerinnung haben, wie z. B. Hirudin, Thrombin, Hementin oder Thrombin.
30
35

Tabelle 1: Zusammensetzung der Medien; FS1, FS2 und FS3 stellen die Zufütterungs-Medien dar, die in den verschiedenen Subphasen der Fed-Batch-Phase verwendet werden.

	Verbindung	Vorkult- ur- Medium mg / l	Haupt- Kultur- Medium mg / l	FS1 mg / l	FS2 mg / l	FS3 mg / l
1	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	8.6×10^3				
2	K_2HPO_4	3×10^3	16.6×10^3			
3	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$		4×10^3		227×10^3	
4	$(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$				169.5×10^3	
5	NH_4Cl	1×10^3				
6	NaCl	5×10^2				
7	Zitronensäure		2.1×10^3			
8	Fe(III)-citrat-hydrat	60.0	75.0			5×10^3
9	H_3BO_3	3.0	3.8			250
10	$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	15.0	18.8			125
11	$\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	8.4	10.5			700
12	$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	1.5	1.9			125
13	$\text{Na}_2\text{MO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	2.5	3.1			213
14	$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	2.5	3.1			213
15	$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	8.0	10			668
16	Glucose	10×10^3	25×10^3	670×10^3		
17	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	600	1.5×10^3	19.8×10^3		
18	Ampicillin	100	100			

Beispiel 1:

Zur Herstellung eines rekombinanten *E. coli*-Wirts wurde der prototrophe *E. coli*-K12-Stamm RV308 (*lac74-galISII::OP308strA*), (Maurer et al., 1980, J. Mol. Biol. 139, 147-161; ATCC 31608) verwendet. Die Transformation mit einem zur Expression geeigneten Vektor sowie alle anderen erforderlichen DNA-Manipulationen erfolgten, sofern nicht anderswo erläutert, nach Standardmethoden. Plasmidfreie *E. coli* RV308 Zellen wurden als Kontrolle in einer entsprechenden Hochzell-dichte-Fermentation eingesetzt.

Der Vektor pHKK wurde, wie folgt, konstruiert (Abb. 2): das kleine MluI-Fragment aus pAK100 (Krebber u. Plückthun, 1995), das den starken transkriptionalen Terminator t_{11P} (Nohno et al., s. o.) in der "upstream"-Region von *lac p/o* enthält, wurde in das Plasmid pASK40 (Skerra et al., 1991, Biotechnol. 9, 273-278) inseriert. Die Insertion von *hok-sok* DNA wurde durch zwei weitere Klonierungsschritte bewerkstelligt: das *aphA*-Gen aus pKG1022 (Gerdes, 1988, s. o.) wurde durch zweifache Verdauung mit XhoI und EcoRI entfernt, mit DNA Polymerase I (Klenow Fragment) aufgefüllt und religiert. In einem zweiten Schritt wurde das modifizierte BamHI-Fragment aus pKG1022 in die einzige BamHI-Schnittstelle des ersten Klonierungsproduktes kloniert. Der Miniantikörper stammt von einem single-chain Fragment ab, in dem die variablen Domänen in V_H - V_L -Richtung mit einem flexiblen Linker (gly₄ser)₃ verbunden wurden, gefolgt von einer prolinreichen Hinge-Region und einer abgewandelten "helix-turn-helix"-Domäne (dhlx) (Pack et al., 1993, Biotechnol. 11, 1271-1277). Die DNA-Sequenzen, Primer, Amplifikationen und Klonierungen der leichten und schweren Kette von murinem/humanisiertem MAb 425 ist in der WO 92/15683 ausführlich beschrieben. Zur Sekretion des scFv425dhlx-Fragmentes in das Periplasma wurde die V_H -Domäne N-terminal an die *pelB*-Signalsequenz fusioniert. Die T7g10-Ribosomen-Bindungsstelle (Shine Dalgarno) wurde mittels PCR-Methodik in die XbaI und SfiI -Schnittstellen von pEG1 (Strittmatter et al., 1995) kloniert. Die fertige scFv425dhlx Expressionskassette wurde zwischen die XbaI und HindIII Schnittstellen kloniert. Hieraus ergab sich der Expressionsvektor pHKK gemäß Abb. 2.

Beispiel 2:

Die Zusammensetzungen der Medien für die Vorkulturen in Erlenmeyer-Kolben, der Hauptkultur in einem mit Rührmechanik ausgestatteten Tankreaktor (Biostat ED10, B. Braun, Biotech International, Melsungen, FRG) sowie der Zufütterungsmedien FS1, FS2 und FS3 sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Das Hauptkulturmedium (8 l) wurde im Vergleich zu dem Medium bei Riesenberg et al., 1991 (s. o.) modifiziert. Um Präzipitationen zu verhindern, wurden die Bestandteile in der angegebenen Reihenfolge der Tab. 1 hinzugegeben. Glucose und Magnesiumsulfat wurden als separat autoklavierte Lösungen hinzugegeben. Der Reaktor wurde bei 26° C, einem Druck von 0.15 MPa, einem pH-Wert von 6.8 und einer durchschnittlichen Belüftungsrate von 10 l / min betrieben. Zur Einstellung des pH-Wertes wurde 25% -iger wäßriger Ammoniak verwendet. Ammoniak und Ucolub N115® (Fragol Industrieschmierstoffe GmbH, Mühleim/Ruhr, FRG) wurden mittels Sensorkontrolle während der Fermentation zur pH-Regulierung, bzw. als Antischaummittel hinzugegeben. FS1 wurde wie folgt hergestellt: 750 g Glucose und 22.2 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ wurden getrennt in 600 ml bzw. 50 ml H_2O gelöst. Die Lösungen wurden nach erfolgter Autoklavierung miteinander gemischt. FS2 wurde hergestellt durch Auflösen von 227 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ und 169.5 g $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ in Wasser unter Hinzufügung von 60 ml 25%-igem NH_3 , um den pH-Wert auf 6.8 vor dem Autoklavieren einzustellen. FS3 wurde aus Stocklösungen in folgender Reihenfolge zubereitet: 50 ml Fe(III)-citrat-hydrat (6 g / l), 0.5 ml H_3BO_3 (30 g / l), 0.5 ml $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (10 g / l), 0.5 ml EDTA $\times 2\text{H}_2\text{O}$ (84 g / l), 0,5 ml $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (15 g / l), 0.5 ml $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (25 g / l), 0,5 ml $\text{CoCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (25 g / l) und 10 ml $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (4 g / l).

Beispiel 3:

Mehrere Kolonien aus einer Petrischale, gewachsen auf LB-Agar bei 26 °C, dienten dazu, 20 ml Flüssig-LB-Medium zu überimpfen. Nach 5-stündigem Schütteln (200 rpm, 26 °C) wurde 1ml in 100 ml Vorkulturmedium in einen 500 ml Kolben überführt und weiterinkubiert. 10 ml dieser Vorkultur wurden benutzt, um 100 ml neues Vorkulturmedium zu überimpfen. Auf diese Weise wurden 9 Vorkulturen erzeugt, die dazu benutzt wurden, zusammen 8 l Hauptkulturmedium im Fermenter mit einem anfänglichen $\text{OD}_{550} \approx 0.2$ zu überimpfen.

Beispiel 4

Der Aufbau des 10 l-Bioreaktors mit Zubehör und Kontrolleinrichtungen ist in Abb. 1 dargestellt. Die Kultivierung im Hochzelllichtfermentations-Maßstab erfolgte mittels einer digitalen Meß- und Kontrolleinheit (DCU), einem Multi-fermenter-Kontrollsystem (MFCS) und einer Gasfluß-Kontrolleinheit. CO₂- und Sauerstoff-Abgabe wurden ständig gemessen. Nach Überimpfung diente der Bioprobensammler MX-3 (New Brunswick Scientific, Watford, UK), um aseptische Proben zu nehmen und off-line Datenanalyse zu ermöglichen (Webb et al., 1990, Biotechnol. 8, 926-928). Die Kontrolleinheiten hielten eine Einströmgasflußrate von 10 l / min, einen pH-Wert von 6.8, eine Temperatur von 26°C und einem Druck von 0.15 MPa aufrecht. Zwei Kontrollschleifen garantierten aerobe Wachstumsbedingungen bei einem pO₂-Wert von 20%. Alle wichtigen physikalischen Größen wurden während der ganzen Fermentation angezeigt und aufgezeichnet.

Während der Fed-Batch-Phase wird die Glucose-Konzentration in der Kultur bei 1.5 g / l gehalten. Hierzu wurde ein modifiziertes Flußinjektionsanalysegerät (FI Astar 5020 Analyzer mit Photometer und Detektionkontrolleinheit, Tecator AB, Schweden) eingesetzt. Details dieses Systems und seiner Arbeitsweise sind im Stand der Technik beschrieben (z. B. Pfaff et al., 1995, In Munack A., Schügerl K (eds.): Computer Applications in Biotechnology, Elsevier Science Ltd., Oxford, 6-11).

Die Zelldichte wurde aus Messung der optischen Dichte bei 550 nm errechnet. Die Plasmidstabilität wurde nach Pack et al, 1993 (s. o.) bestimmt.

Beispiel 5:

Die quantitative Bestimmung der synthetisierten Miniantikörper erfolgte nach der Methode von Pack et al., 1993 (s. o.). Die Menge der funktionsfähigen Miniantikörper wurde durch ELISA, die Gesamtmenge an Miniantikörper durch SDS-PAGE in 12 % Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970) gefolgt von Gelscannen. Für die ELISAs wurden Mikrotiterplatten mit humanen EGFR-Rezeptor (z.B. aus WO 92/15683) beschichtet. Die gebundenen Miniantikörper wurden mit anti-scFv425 Kanninchen-Serum und Peroxidase-konjugiertem Ziegen anti-Kanninchen IgG (Jackson ImmunoResearch Inc, USA) detektiert. Die Ausbeute von aktiven Miniantikörpern wurde aus Verdünnungsreihen der aufgereinigten Miniantikörper errechnet. In ei-

ner Kontrolle wurde gezeigt, daß das anti-scFv425 Kanninchen-Serum keine feststellbare Kreuzreaktion mit anderen Komponenten des plasmidfreien Rohextraktes von *E. coli* RV308 aufweist. Ferner hatte der Zusatz von diesem Rohextrakt zu einer Verdünnungsreihe des gleichen Antikörpers in aufgereinigter Form keinen Effekt auf die ELISA-Signale. Zur Bestimmung der Gesamtmenge an Miniantikörper wurden Coomassie Brilliantblau gefärbte Gele photometrisch detektiert und die Konzentration der Miniantikörper wurde aus einer Verdünnungsreihe des aufgereinigten Miniantikörpers, der auf demselben Gel aufgetrennt worden war, errechnet. Als Kontrolle diente ein analoger Ansatz, bei dem *E. coli* Wirtszellen verwendet wurden, die keine Miniantikörper produzierten,

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Fremdprotein in *E. coli*- Zellen, die mit ei-
nem das Fremdgen und einen induzierbaren Promoter tragenden Plasmid
transformiert wurden, mittels Hochzelldichtefermentation über Batch- und
Fed-Batch Stufen ohne jegliche Wachstumsbegrenzung durch Substrate oder
metabolische Nebenprodukte, und Isolierung und Aufreinigung des expri-
mierten Proteins aus dem Kulturmedium, wobei die Konzentration an
Substraten in der Fed-Batch Phase über ein kontinuierliches automatisches
oder semi-automatisches Analyse- und Zugabesystem geregelt und / oder
gesteuert wird, dadurch gekennzeichnet, daß
in der Fed-Batch Phase (i) die Konzentration der Kohlenstoffquelle im Me-
dium in einem Bereich zwischen 0.1 g / l und 25 g / l unter Beibehaltung
von unlimitiertem Wachstum der Zellen ($\mu = \mu_{\max}$) konstant gehalten wird,
(ii) die Produktion des Fremdproteins innerhalb besagter Fed-Batch Phase
bei einer Zelldichte zwischen 10 und 80 g / l durch Induktion des Promoters
gestartet wird, und (iii) nach erfolgter Produktsynthese-Induktion verwertba-
rer Stickstoff und Phosphat sowie Salze von Spurenelementen kontinuier-
lich zugefüttert werden, wobei (iv) während der gesamten Fed-Batch Phase
der pO₂-Wert durch entsprechende Sauerstoffeinleitung in die Fermentati-
onsbrühe zwischen 5 und 25 % eingestellt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration
der Kohlenstoffquelle während der Fed-Batch Phase in einem Bereich zwi-
schen 1 und 3 g / l konstant gehalten wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Stickstoff,
Phosphat und Spurenelemente bei einer Zelldichte zwischen 50 und 80 g / l
zugesetzt werden.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelldichte gemäß (ii) aus Anspruch 1 20 bis 60 g / l beträgt.
- 5 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß Zelldichten zwischen 100 und 150 g / l in der Fed-Batch Phase erreicht werden können.
- 10 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein Expressionsvektor mit einer von zwei Terminatorsequenzen flankierten das Fremdgen enthaltenden Expressionskassette eingesetzt wird.
- 15 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der verwendete Expressionsvektor zusätzlich ein Suizidsystem, vorzugsweise das *hok-sok*-Suizidsystem enthält.
- 20 8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß ein Fremdgen eingesetzt wird, das für ein Antikörperfragment, insbesondere einen Miniantikörper codiert.
- 25 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß ein Expressionsvektor gemäß einem der Ansprüche 12 - 16 eingesetzt wird.
- 30 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß ein *E. coli*-Stamm eingesetzt wird, der während der Fermentationsphase nicht mehr als 5 g / l Acetat im Kulturmedium akkumuliert.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der *E. coli*-Stamm RV308 (ATCC 31608) eingesetzt wird.
- 5 12. *E. coli*-Expressionsvektor, geeignet für die Expression von Fremdproteinen unter Hochzelldichtefermentations-Bedingungen, dadurch gekennzeichnet, daß er folgende Merkmale enthält:
- (i) eine upstream- und eine downstream-Terminatorsequenz,
 - 10 (ii) das lac Promoter/Operatorsystem,
 - (iii) T7g10- Shine Dalgarno-Sequenz,
 - (iv) die pelB- oder ompA-Signalsequenz,
 - (v) die Sequenz des Fremdgens,
- 15 13. Vektor nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich ein Suizid-Sytem, insbesondere das *hok-sok* Suizidsystem-Sequenz enthält.
- 20 14. Vektor nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß die „upstream“- Terminatorsequenz t_{HP} und „downstream“-Terminatorsequenz t_{LPP} ist.
- 25 15. Vektor nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Fremdgen eine Sequenz enthält, die für die V_H - und die V_L -Kette eines Miniantikörpers codiert.
- 30 16. Expressionsvektor mit der Bezeichnung pHKK gemäß dem Konstruktionschema der Abb. 2.
- 35 17. Transformierter *E. coli*-Expressionswirt RV308[pHKK], erhältlich durch Transformation von RV308 (ATCC 31608) mit einem Expressionsvektor nach Anspruch 14.

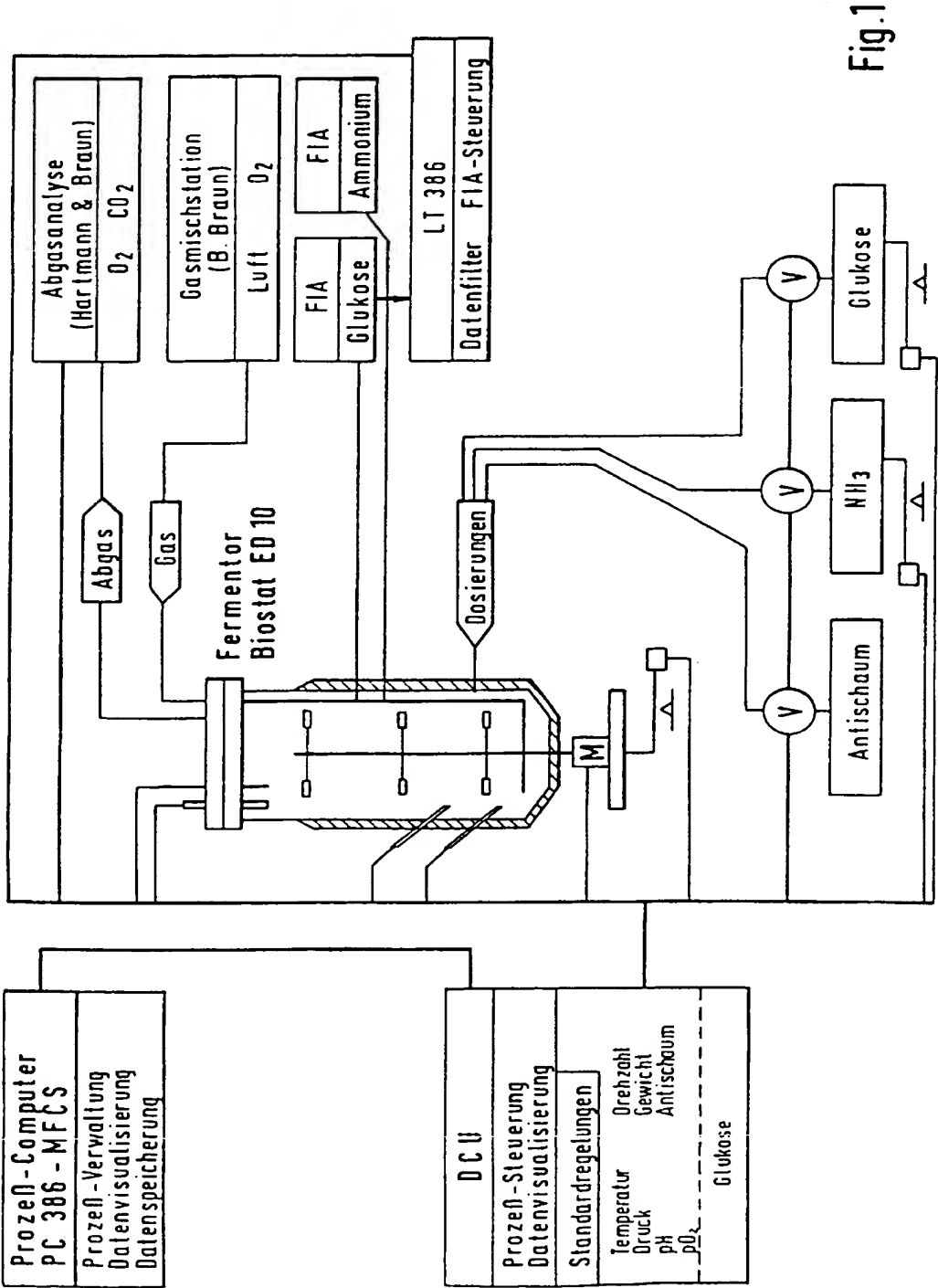
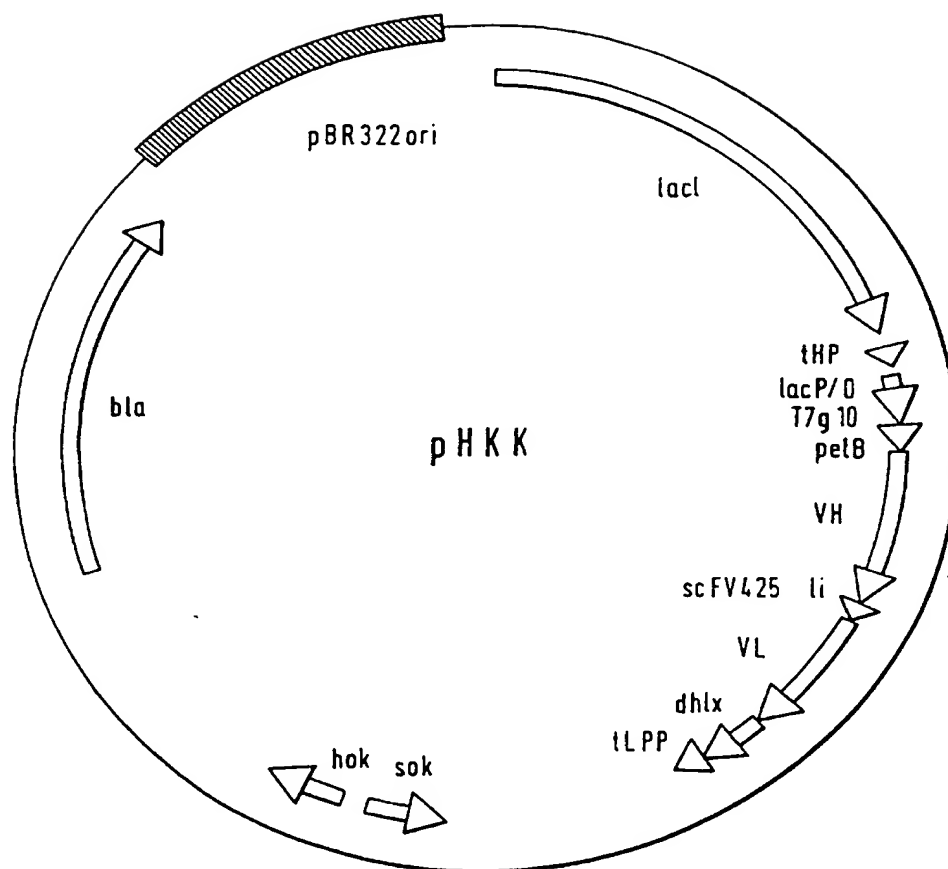


Fig.1

Fig.2



3 / 4

Fig.3a

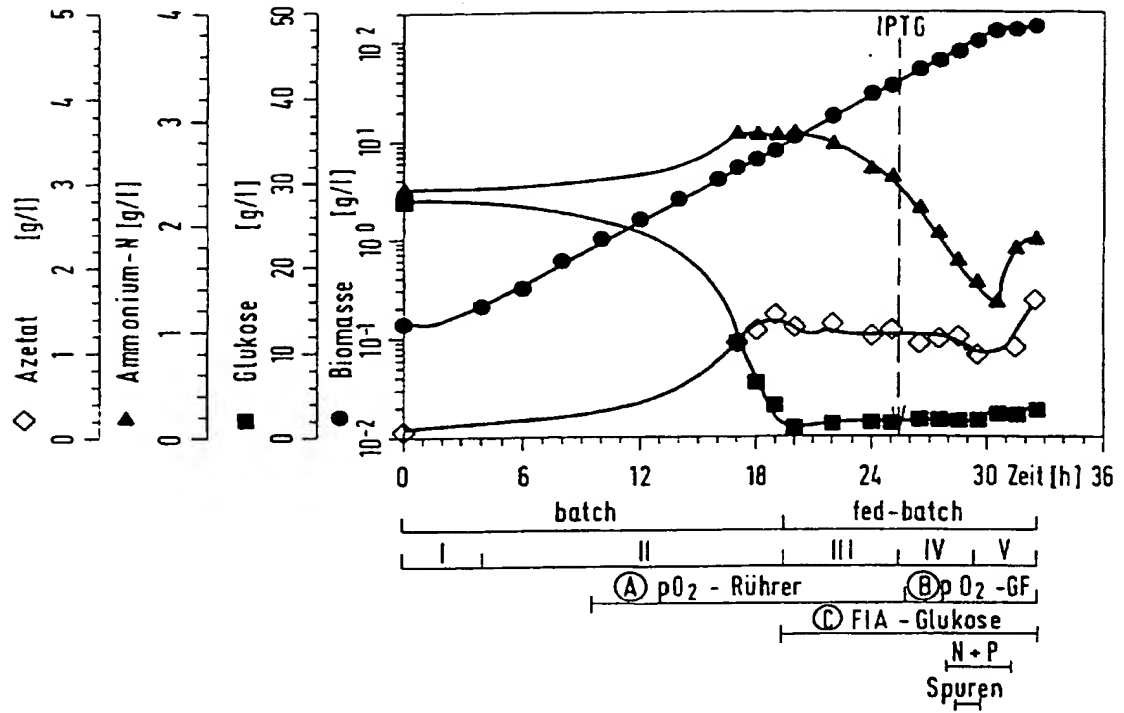
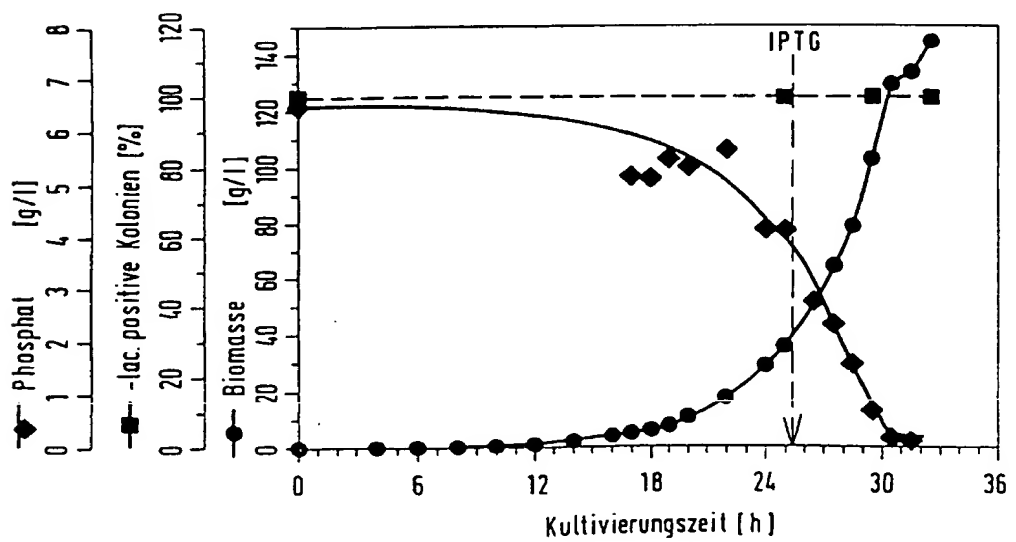


Fig.3b



4/4

Fig.3c

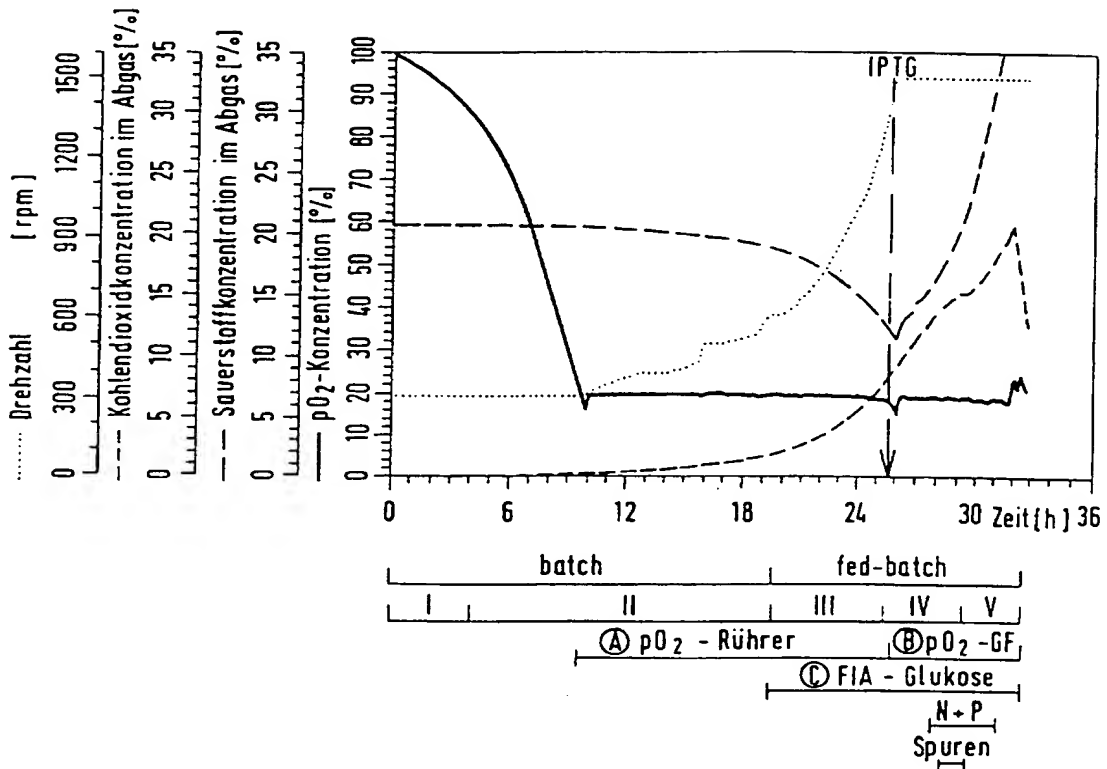
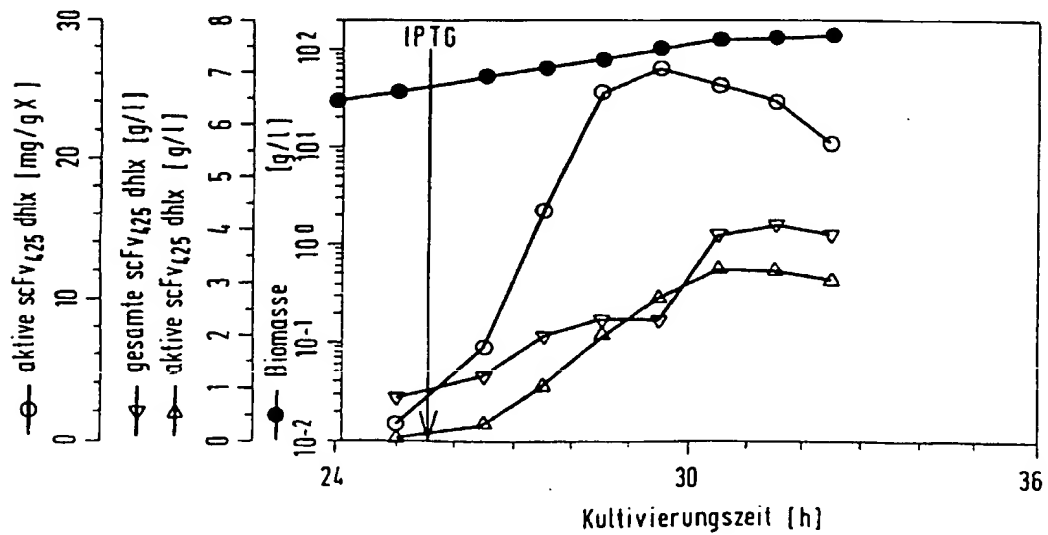


Fig.3d



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 96/05260

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12P21/02 C12N15/72 C12N1/21 C07K16/28 //(C12N1/21,
C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC:

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12P C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BIO/TECHNOLOGY, vol. 11, no. 11, 1 November 1993, pages 1271-1277, XP000608190 PACK P ET AL: "IMPROVED BIVALENT MINIANTIBODIES, WITH IDENTICAL AVIDITY AS WHOLE ANTIBODIES, PRODUCED BY HIGH CELL DENSITY FERMENTATION OF ESCHERICHIA COLI" cited in the application see the whole document ---	1-17
A	JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 39, no. 1, 21 February 1995, pages 59-65, XP002026053 KORZ D. ET AL.: "Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of Escherichia coli" cited in the application see the whole document ---	1-11
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 February 1997

Date of mailing of the international search report

11.03.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patenlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (- 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (- 31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 96/05260

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 32, no. 3, 28 February 1994, pages 289-298, XP002026054 HELLMUTH K.: "Effect of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of Escherichia coli TG1" see the whole document ---	1-11
A	WO 92 15683 A (MERCK PATENT GMBH) 17 September 1992 cited in the application see the whole document ---	15,16
A	BIO/TECHNOLOGY, vol. 6, December 1988, pages 1402-1405, XP002026055 GERDES K.: "The PARB (HOK/SOK) locus of plasmid R1: a general purpose plasmid stabilization system" cited in the application see the whole document -----	12-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PC I/EP 96/05260

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9215683 A	17-09-92	AU 658396 B	13-04-95
		AU 1340392 A	06-10-92
		CA 2082160 A	07-09-92
		CZ 9203327 A	16-02-94
		EP 0531472 A	17-03-93
		HU 65687 A	28-07-94
		SK 332792 A	03-07-96
		US 5558864 A	24-09-96

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC1/EP 96/05260

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12P21/02 C12N15/72 C12N1/21 C07K16/28 //(C12N1/21, C12R1:19)		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikations Symbole) IPK 6 C12P C12N C07K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BIO/TECHNOLOGY, Bd. 11, Nr. 11, 1. November 1993, Seiten 1271-1277, XP000608190 PACK P ET AL: "IMPROVED BIVALENT MINIANITBODIES, WITH IDENTICAL AVIDITY AS WHOLE ANTIBODIES, PRODUCED BY HIGH CELL DENSITY FERMENTATION OF ESCHERICHIA COLI" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-17
A	JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 39, Nr. 1, 21. Februar 1995, Seiten 59-65, XP002026053 KORZ D. ET AL.: "Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of Escherichia coli" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-11
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 25. Februar 1997		Abschlusssdatum des internationalen Recherchenberichts 1. 03. 97
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fac (+ 31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Kania, T

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte: nales Aktenzeichen
PCI/EP 96/05260

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 32, Nr. 3, 28.Februar 1994, Seiten 289-298, XP002026054 HELLMUTH K.: "Effect of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of Escherichia coli TG1" siehe das ganze Dokument ---	1-11
A	WO 92 15683 A (MERCK PATENT GMBH) 17.September 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	15,16
A	BIO/TECHNOLOGY, Bd. 6, Dezember 1988, Seiten 1402-1405, XP002026055 GERDES K.: "The PARB (HOK/SOK) locus of plasmid R1: a general purpose plasmid stabilization system" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	12-17

Angaben zu Veröffentlich. ., die zur selben Patentfamilie gehören

PC1/EP 96/05260

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)